

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Genética



TESIS DOCTORAL

Papel de la progranulina en los mecanismos de regulación de supervivencia-muerte celular en la demencia frontotemporal

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carolina Alquézar Burillo

Director

Ángeles Martín Requero

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Departamento de Genética



**PAPEL DE LA PROGRANULINA EN LOS
MECANISMOS DE REGULACIÓN DE
SUPERVIVENCIA/MUERTE CELULAR EN LA
DEMENCIA FRONTOTEMPORAL.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR:**

Carolina Alquézar Burillo

**Bajo la dirección de la doctora
Ángeles Martín Requero**

Madrid, 2014

Portada:
“Unravelling Bolero”, de Anne Adams
(Diagnosticada de Demencia Frontotemporal)

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Departamento de Genética



**PAPEL DE LA PROGRANULINA EN LOS
MECANISMOS DE REGULACIÓN DE
SUPERVIVENCIA/MUERTE CELULAR EN LA
DEMENCIA FRONTOTEMPORAL.**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Carolina Alquézar Burillo

Realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)

bajo la dirección de la doctora Ángeles Martín Requero.



Madrid, 2014

VºBº DIRECTORA DE TESIS

VºBº INTERESADA

Dra. Ángeles Martín Requero

Carolina Alquézar Burillo



La presente tesis se presenta en Formato Publicaciones, como una colección de cuatro artículos, tres de ellos ya publicados en revistas internacionales y el último enviado y pendiente de publicación.

El trabajo aquí presentado ha sido realizado con cargo a los siguientes proyectos de investigación:

MICINN SAF2010-15700 (2010-2011). “Papel de Progranulina en los mecanismos de regulación de supervivencia/muerte en la demencia frontotemporal”.

MICINN SAF2011-28630 (2012-2014). “Mecanismos moleculares neurodegenerativos en la demencia frontotemporal (FTLD-TDP): Déficit de progranulina, desregulación del ciclo celular y acumulación de TDP-43”.

FUNDACIÓN RAMÓN ARECES (2012-2015). “Mecanismos moleculares, modelos experimentales y aproximaciones terapéuticas en la demencia lobar frontotemporal (DLFT-TDP)”.

Y gracias al CIBERER

Agradecimientos



Agradecimientos

Parece que fue ayer cuando llegué al CIB, y eso que ya han pasado cinco años. Hay muchos motivos que hacen especial esta etapa de mi vida y el principal de todos es la gente que ha compartido conmigo estos años, y por eso les quiero dar las gracias.

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Ángeles Martín Requero por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por su gran labor como directora de tesis. Gracias Ángeles por depositar tu confianza en mí.

También al Dr. Roberto Parrilla, la Dra. Matilde Sanchez Ayuso y la Dra. Consuelo Gonzalez Manchón, así como a toda la gente que ha pasado por sus laboratorios. Con ellos he compartido tiempo y espacio. Gracias por permitirme aprender de vuestra experiencia.

Me gustaría agradecer también a todas las personas que de algún modo han ayudado a la realización de esta tesis. Gracias a los servicios de CIB, en especial proteómica, confocal y citometría por la labor tan importante que hacen, y gracias a Isabel por la maquetación de esta tesis.

Quiero expresar mi gratitud al grupo de neurobiología del Hospital Donostia de San Sebastian, en especial al Dr. Adolfo López de Munain, el Dr. Fermín Moreno y la Dra. Ainhoa Alzualde. Por ser siempre tan accesibles, por su asesoramiento en la parte más clínica de esta tesis y por dar siempre su opinión crítica en cada trabajo que hemos publicado. Por supuesto, gracias también a los pacientes y sus familias, aunque no haya tenido contacto con ellos son la parte más importante de esta tesis. Este trabajo se ha hecho por y para ellos.

Me gustaría también agradecer al departamento de genética de la facultad de biología de la Universidad Complutense de Madrid, en especial a mi tutor Francisco Javier Fernández Nuño, por ayudarme con los trámites de la tesis y por interesarse tanto por mi trabajo.

Estos años no habrían sido lo mismo sin mis compañeros de laboratorio. Ellos son

los que más me han aguantado todo este tiempo, y por eso les quiero dar las gracias. Desde Úrsula con la que coincidí sólo unos pocos meses hasta Ana, la nueva adquisición del 242 que recoge el testigo del laboratorio de Ángeles. Por supuesto, agradecer también a Fernando, que me enseñó a dar los primeros pasos dentro el laboratorio. Gracias por tu paciencia, por tus consejos y por estar siempre dispuesto a echar una mano. Y como no agradecer a Noemí, con la que he pasado más tiempo en el CIB. Gracias Noe por estar siempre ahí, por tu generosidad, por compartir tu experiencia conmigo, por aportar siempre buenas ideas, por tu risa y por tu apoyo. Gracias a todos de verdad, me encanta haber coincidido con todos y cada uno de vosotros en esta etapa que siempre recordaré con mucho cariño.

Además de los compañeros de laboratorio, hay otra mucha gente que hace que el CIB, por lo menos para mí, sea especial. Gracias a Amaia, Virginia, Rodri, Carlos, Mikel, Lu, Eva, Ana Cris, Mari Paz, Kike, Rubén, Asier y Pericacho, por las cañas de los jueves, por las casas rurales, por las cenas de navidad, por las fiestas de la primavera y por tantas risas. Me siento feliz de haber conocido a gente como vosotros.

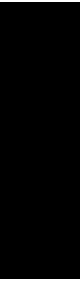
Agradecer también a mis biólogos, vosotros también habéis hecho que me sienta especial por conocerlos. Gracias a todos, porque hemos compartido muchos años de experiencias, épocas buenas y otras no tan buenas. Gracias por alegraros por mis éxitos y hacerme ver que cuando algo sale mal siempre hay solución. Gracias a todos, aunque estéis lejos siempre os siento cerca. En especial a Paula, Paulita, María, Isa, Maribel, Ainhoa, Paloma, Anita, Pablulu, Piñero, Jero, Djordje y Gon. Habéis sido para mí como una familia en Madrid.

Y por supuesto gracias a mi familia, esta vez la de verdad. Gracias a mis abuelos, a mis tíos y mis primos, y por supuesto gracias a mis padres. Gracias, porque sé el esfuerzo que habéis hecho para que haya llegado hasta aquí, gracias porque sé lo que os ha costado que estuviera lejos de casa, gracias porque sé lo que me echáis de menos (y yo a vosotros), gracias por apoyarme en todo, escucharme e intentar entenderme, y sobre todo gracias



por creer en mí. Sólo por ver lo orgullosos que os sentís, todo el esfuerzo ya ha valido la pena. Os quiero.

Y en último lugar gracias a Edu. Porque tú eres el que ha estado a mi lado todos los días. Porque eres el que siempre me ha escuchado al llegar a casa. Porque contigo he celebrado todos los éxitos y me has apoyado en todos mis fracasos. Gracias por enseñarme tanto y por hacer que me sienta tan afortunada de que estés a mí lado. Tú eres una parte muy importante de esto.



“Es preciso sacudir enérgicamente el bosque de las neuronas cerebrales adormecidas; es menester hacerlas vibrar con la emoción de lo nuevo e infundirles nobles y elevadas inquietudes.”

Ramón y Cajal

“Cada fracaso enseña al hombre algo que necesitaba aprender”

Charles Dickens



Abreviaturas

Abreviaturas

2xRBD-Gly: *2-RNA-binding domain Glycine*

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

APOB: Apolipoproteína B

APOE: Apolipoproteína E

APPNF: Afasia Primaria Progresiva No Fluente

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATXN2: *Ataxina 2*

Bcl-x: B-cell lymphoma-extra large

Bim: *Bcl2-interacting mediator of cell death*

BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine

C9ORF72: *Chromosome 9 open reading frame 72*

CaMKII: Calmodulina kinasa II

CDC7: cell division kinase 7

CDK: *Cyclin-dependent kinase* o kinasa dependiente de ciclina

CHMP2B: *Chromatin-modifying protein 2B*

CHOP: *C/EBP homologous protein*

Cip/kip: *CDK Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein.*

CMA: *chaperone mediated autophagy* o autofagia mediada por chaperonas

CMSP: células mononucleares de sangre periférica

CQ: cloroquina

DAPK1: *Dead-associated protein kinase 1*

DFT-EMN: Demencia Frontotemporal asociada a enfermedad de la motoneurona.

DFT-vc: Demencia Frontotemporal variante conductual

DFT: Demencia Frontotemporal

DFTP-17: Demencia Frontotemporal y Parkinsonismo ligada al cromosoma 17.

DLFT-tau: Degeneración Lobar Frontotemporal asociada a acúmulos de la proteína tau.

DLFT-TDP: Degeneración Lobar Frontotemporal asociada a acúmulos de la proteína TDP-43

DLFT: Degeneración Lobar Frontotemporal

DMSO: Dimetilsulfóxido

DS: Demencia semántica

E2F: Factor de elongación 2

EA: Enfermedad de Alzheimer

EBV: virus de Epstein-Barr

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica

EP: Enfermedad de Parkinson

ERK1/2: *Extracellular signal regulated kinase 1/2*

ESCRT-III: *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport III* o Complejo Secretor Endosomal tipo III Requerido Para el Transporte

FBS: *Fetal Bovine Serum* o Suero Fetal Bovino

FCE: Fluido cerebroespinal

FUS: *Fused in Sarcoma*

G3BP-1: *GTPase-activating protein binding protein 1*

gadd7: *growth-arrested DNA damage-inducible gene 7*

GE: Gránulos de estrés

GRN: Gen *granulina*

GSK-3: Glicógeno Sintasa kinasa 3

GSP: Gliosis Subcortical Progresiva

GWAS: *Genome-wide association study* o estudio de asociación del genoma completo.

HDAC: Histona deacetilasa

hnRNPA2B1: *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1*

hnRNPs: *heterogeneous nuclear Ribonucleoproteins* o proteínas ribonucleares heterogéneas

HSP70/HSP90: *Heat Shock proteins 70/90* o proteínas de choque térmico 70/90

IBMPFD: *Inclusion Body Myopathy with early-onset Paget disease and Frontotemporal Dementia* o miopatía con cuerpos de inclusión asociada a la enfermedad de Paget y Demencia Frontotemporal.

INK4: *Inhibitors of Cyclin D-dependent kinase 4*

iPS: *Induced pluripotent stem cells*

lncRNAs: *Long-non-coding RNA*

LTR: *Long terminal repeat signals* o secuencias terminales repetidas largas.

MAPK: *Mitogen-activated Protein kinases* o proteínas kinasas activadas por mitógenos.

MAPT: *Microtubules associated protein tau* o proteína tau asociada a los microtúbulos

miARN: micro ARN

MRI: *Magnetic Resonance Imaging* o resonancia magnética de imagen

Nlgn1: Neuroligin 1

NMD: *Nonsense Mediated Decay*

NMDA: N-metil-D-aspartato

Nrxn1, Nrxn3: Neurexin 1 y 3

Park2: Parkin 2

PDI4: Protein disulfide isomerase 4

PET: *Positron emission tomography* o tomografía por emisión de positrones

PGRN: Progranulina

PI3kinase: fosfatidil inositol kinasa 3

PKC: Proteína kinasa C

PLC: Fosfolipasa C

pRb: Proteína del Retinoblastoma

PSP: Parálisis Supranuclear Progresiva

PT: Toxina pertussis

ROS: *Reactive oxygen species* o especies reactivas de oxígeno

SAHA: Suberoyl anilide hidroxamic acid

SCB: Síndrome Corticobasal

SLPI: *Secretory leukocyte protease inhibitor* o inhibidor de la proteasa secretora de leucocitos.

SMarT: *Spliceosome-mediated RNA trans-splicing*

SMN: *Survival Motor Neuron*

SNC: Sistema Nervioso central

SPECT: *Single Photon Emission Computed Tomography* o la tomografía computarizada de emisión monofotónica

SQSTM1: *sequestome-1*

SSRIs: Inhibidores selectivos de recaptación de serotonina

TARDBP: *TARDNA-Binding Protein*

TDP-43: *TARDNA-Binding Protein 43*

TGF α : Transforming growth factor α

TIA-1: *T-cell intracellular antigen 1*

TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

Degeneración Lobar Frontotemporal asociada a mutaciones en progranulina

UBQLN: *Ubiquilin*

UPS: Sistema ubiquitina-proteasoma

VCP: *Valosin-containing protein*

VIH-1: Virus de Inmunodeficiencia humana

Wnt: *Wingless/Int*

Índice de Contenidos

Índice de contenidos

Introducción.....	31
1. Breve descripción, historia y epidemiología de la enfermedad	33
2. Presentación Clínica	35
2.1. Demencia Frontotemporal variante conductual (DFT-vc).....	35
2.2. Demencia Semántica (DS).....	36
2.3. Afasia primaria progresiva no fluente (APPNF).....	37
2.4. Síndromes Secundarios	37
3. Clasificación Histopatológica.....	39
3.1. DLFT con marcaje positivo para la proteína TAU (DLFT-TAU)	40
3.2. DLFT con marcaje positivo para la proteína TDP-43 (DLFT-TDP).....	41
3.3. DLFT con marcaje positivo para la proteína FUS (DLFT-FUS).....	45
3.4. DLFT con marcaje positivo para Proteínas Ubiquitinizadas del Sistema de Proteasoma (UPS de <i>Ubiquitin Proteasome System</i>) (DLFT-UPS).....	46
3.5. DLFT no asociada a inclusiones (DLFT-ni)	46
4. Genética de la enfermedad	47
4.1 .DLFT asociada a mutaciones en MAPT.....	48
4.2. DLFT asociada a mutaciones en GRN	50
4.3. DLFT asociada a mutaciones en VCP	54
4.4. DLFT asociada a mutaciones en CHMP2B.....	55
4.5. DLFT asociada a mutaciones en C9ORF72.....	55
4.6. DLFT asociada a mutaciones en TARDBP.....	56
5. Diagnóstico de la DLFT.....	57
5.1 Criterios Diagnósticos de la DLFT.....	58
5.2 Neuroimagen en DLFT	59
5.3 Marcadores Biológicos en la DLFT	61
6. Etiopatogénesis de la DLFT	63
6.1 Inflamación como causa de neurodegeneración	63
6.2 Neurodegeneración asociada a inclusiones intracelulares	66

6.2.1 Pérdida neuronal asociada a inclusiones de tau	66
6.2.2 TDP-43 y FUS, pérdida neuronal asociada a proteínas de unión a ARN	67
6.3. Estrés oxidativo como causa de neurodegeneración	70
6.4. Neurodegeneración mediada por fallos en la degradación de proteínas	72
6.5. Neurodegeneración asociada a alteraciones en la apoptosis y autofagia.....	73
6.5.1. Apoptosis.....	74
6.5.2. Autofagia.....	77
6.6. Alteraciones en el ciclo celular como causa de neurodegeneración.....	80
7. Perspectivas terapéuticas.....	85
7.1 Tratamientos sintomáticos	85
7.1.1. Tratamientos dirigidos a los síntomas comportamentales y psiquiátricos.....	86
7.1.2. Tratamientos dirigidos a los síntomas cognitivos.....	88
7.1.3. Tratamientos contra los trastornos motores.....	89
7.2 Búsqueda de Tratamientos dirigidos contra dianas moleculares de la DLFT	90
7.2.1.Terapias dirigidas al tratamiento de la DLFT-TAU	90
7.2.2. Terapias dirigidas al tratamiento de la DLFT asociada a mutaciones en GRN	93
7.2.3. Terapias dirigidas al tratamiento de la DLFT-TDP	96
7.2.4. Otras posibles dianas moleculares.....	98
8. Modelos de estudio de la DLFT.....	101
8.1. Modelos Animales	101
8.2 Modelos Celulares.....	104

Objetivos	107
-----------------	-----

Material y métodos	111
--------------------------	-----

1. Establecimiento de las líneas celulares linfoblásticas.....	115
2. Características, diagnóstico y selección de los individuos.....	117
2.1. Características clínicas	117
2.2. Características neuropatológicas.....	120
2.3. Estudio y caracterización de la mutación c.709-1G>A	121



Resultados	123
1. Alteración de proteínas reguladoras del ciclo celular en linfoblastos de pacientes de DLFT-TDP portadores de la mutación c.709-1G>A en el gen <i>progranulina</i>	127
2. La inactivación de la vía CDK/pRb normaliza la supervivencia de los linfoblastos que expresan la mutación en <i>progranulina</i> c.709-1G>A, asociada con la DLFT-TDP.....	143
3. La haploinsuficiencia de PGRN aumenta la señalización de Wnt5a en células periféricas de individuos portadores de una mutación en <i>progranulina</i> asociada a la DLFT	159
4. Aumento de los niveles de PGRN e inhibición de la vía MEK/ERK/1/2: Dos nuevas dianas para el tratamiento de la DLFT asociada a mutaciones en <i>progranulina</i>	175
Discusión	197
1. Mecanismos moleculares implicados en la regulación de la proliferación de linfoblastos de pacientes de DLFT-TDP	199
2. Control de la supervivencia/muerte celular en linfoblastos portadores de la mutación c.709-1G>A en GRN asociada a DLFT-TDP	205
3. Papel de la vía de señalización WNT5a en el control de proliferación de linfoblastos portadores de la mutación en GRN C.709-1G>A	209
4. Búsqueda de nuevas aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la DLFT asociada a mutaciones en GRN	215
Conclusiones	219
Bibliografía	223
Resumen en Inglés	277

Índice de Tablas y Figuras



Índice de tablas y figuras

Introducción..... 31

Fig.1: Atrofia de los lóbulos frontal y temporal en el cerebro de un paciente de DLFT 33

Fig. 2: Características patológicas de la DLFT 39

Fig. 3: Características fisiológicas y patológicas de TDP-43 42

Tabla 1: Sistema de clasificación para la DLFT-TDP 44

Fig. 4. Histopatología de la TDP-43).....45

Fig. 5. Representación esquemática de la localización cromosómica, y estructuras genómica y proteica de los genes *GRN* y *MAPT*..... 49

Fig. 6. Representación esquemática del gen *GRN*, ARN mensajero y PGRN..... 50

Fig. 7: Representación esquemática de la proteína PGRN mostrando las mutaciones codificantes..... 52

Fig. 8. Representación esquemática del gen *GRN* mostrando las mutaciones no codificantes o silenciosas 53

Tabla 2: Correlación clinicopatológica y genética de la DLFT..... 57

Fig. 9: Imágenes obtenidas mediante las técnicas de neuroimagen en un individuo diagnosticado de DLFT asociada a mutaciones en *GRN* 60

Tabla 3: Correlación entre el síndrome clínico y la parte del cerebro afectada en la DLFT 61

Fig.10. Representación esquemática de la acción de la progranulina dentro y fuera del sistema nervioso central 64

Fig.11. Esquema representativo de la progresión y regulación del ciclo celular en eucariotas 81

Tabla 4: Terapias farmacológicas para tratar los síntomas de la DLFT..... 87

Tabla 5: Compuestos con potencial terapéutico para el tratamiento de la DLFT-TAU..... 93

Tabla 6: Compuestos con potencial terapéutico para el tratamiento de la DLFT asociada a mutaciones en *GRN*..... 96

Material y métodos 111

Tabla 7: Resumen de los compuestos con potencial terapéutico para el tratamiento de la DLFT que se han usado en este trabajo..... 113

Fig.12. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica..... 115

Fig. 13. Descripción de las familias donantes de sangre..... 117

Tabla 8: Características clínicas y demográficas de los individuos usados para generar las líneas linfoblásticas usadas en este trabajo..... 119

Fig. 14: Análisis inmunohistoquímico del cerebro de un paciente de DLFT asociada a la mutación c.709-1G>A..... 120

Fig. 15. Localización de la mutación c.709-1G>A en el gen *GRN*..... 121

Discusión..... 197

Fig. 16. Esquema representativo del efecto de la mutación c.709-1G>A en los mecanismos de proliferación/supervivencia celular 203

Fig. 17. Esquema de las rutas de señalización alteradas por la haploinsuficiencia de PGRN..... 212



Introducción

1

Breve descripción, historia y epidemiología de la enfermedad

El término Degeneración Lobar Frontotemporal (DLFT) designa a un grupo de síndromes neurodegenerativos muy heterogéneo clínica, genética e histopatológicamente cuya característica común es la atrofia progresiva de los lóbulos frontal y temporal del cerebro de los individuos afectados (Graff-Radford y Woodruff, 2007, Neary, *et al.*, 2005) (Fig. 1).

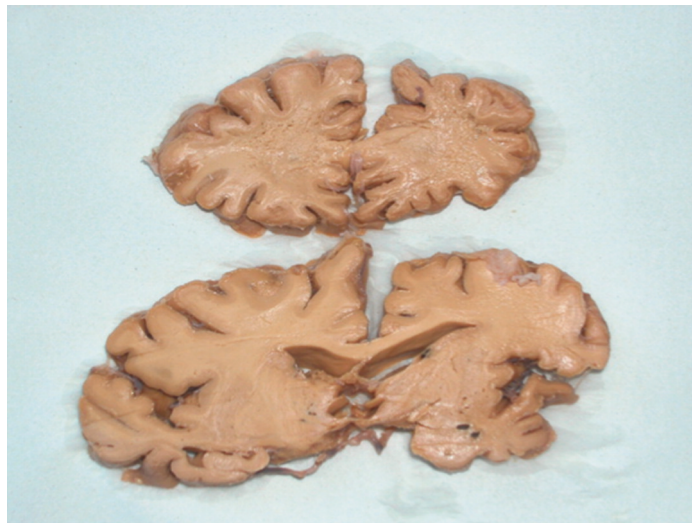


Fig.1: Atrofia de los lóbulos frontal y temporal en el cerebro de un paciente de DLFT: Secciones coronales del lóbulo frontal (superior) y temporal (inferior) del cerebro de un individuo diagnosticado de DLFT asociada a mutaciones en *GRN*. Se observa una atrofia asimétrica que afecta preferentemente al lado izquierdo del cerebro. El hipocampo, la amígdala y el ganglio basal están medio atrofiados. Tomado de (Snowden, *et al.*, 2006).

La primera mención a esta enfermedad data de finales del siglo XIX (Pick 1892) cuando Arnold Pick describió un varón de 71 años que presentaba un deterioro progresivo del lenguaje asociado con una severa atrofia temporal izquierda. Aunque era la primera vez que se planteaba la posibilidad de que un síndrome de demencia pudiera estar originado por una atrofia cerebral focal, se acabó considerando una variante de la Enfermedad de Alzheimer (EA) y se perdió el interés en su estudio. No fué hasta un siglo después cuando renació el interés por esta enfermedad y se empezaron a usar los términos degeneración lobar frontotemporal (Brun, 1987, Gustafson, 1987) o demencia de tipo frontal (Neary, *et al.*, 1988) para referirse a este síndrome. El desarrollo de las técnicas de la biología mole-

cular y la genética ocurrido en los últimos 20 años ha supuesto una auténtica revolución en el conocimiento de la DLFT. El descubrimiento las características genéticas de la enfermedad (Baker, *et al.*, 2006, Cruts, *et al.*, 2006, Hutton, *et al.*, 1998), la identificación de las principales proteínas presentes en las inclusiones neuronales (Neumann, *et al.*, 2006) y el desarrollo de nuevas técnicas de neuroimagen (Kitagaki, *et al.*, 1997) han llevado a la caracterización de nuevas entidades clinicopatológicas, completándose así los principales cuadros clínicos que configuran el esquema actual de la DLFT.

En cuanto a las características epidemiológicas, se ha descrito que en el 75-80% de los casos, la aparición de la DLFT ocurre antes de los 65 años (Neary, *et al.*, 2005, Rabinovici y Miller, 2010) y es considerada la primera causa de demencia presenil con una prevalencia de 10-15 por 100.000 individuos de edades comprendidas entre 45-65 años (Ratnavalli, *et al.*, 2002, Toribio-Diaz y Morera-Guitart, 2008). Además, esta enfermedad se caracteriza por tener un fuerte componente familiar, entre el 30 y el 50% de los pacientes de DLFT tienen algún pariente con una sintomatología parecida (Goldman, *et al.*, 2007, Goldman, *et al.*, 2005, Ikeda, *et al.*, 2004a, Sieben, *et al.*, 2012). La distribución sexual parece ser similar para ambos sexos, a pesar de que en ciertos estudios observan una mayor predominancia de un género u otro en función de las características clínicas (Johnson, *et al.*, 2005, Ratnavalli, *et al.*, 2002). La duración de la DLFT ha sido estimada entre 6 y 11 años a partir de la aparición de los síntomas y en 3 o 4 años después de la diagnosis (Hu, *et al.*, 2009).

2

Presentación Clínica

La heterogeneidad de los diferentes síndromes englobados en el término DLFT hizo necesario el establecimiento de unos criterios clínicos comunes (Neary, *et al.*, 1998) para adoptar una clasificación universal que a su vez facilitara el diagnóstico de la enfermedad.

Según Neary (Neary, *et al.*, 1998), usamos el término Demencia Frontotemporal (DFT) para definir a un conjunto de síndromes clínicos cuya característica común es una alteración progresiva del comportamiento o lenguaje en relación con una atrofia focal de los lóbulos frontal y temporal del cerebro. Se distinguen tres variantes clínicas principales en función de cuáles son los síntomas predominantes y del momento de su aparición en la evolución de la enfermedad: DFT variante conductual (DFT-vc), Demencia Semántica (DS) y Afasia Primaria Progresiva No Fluente (APPNF). Cada variante está asociada con un patrón diferente de atrofia cerebral y con diferentes características histopatológicas. Con el transcurso de la enfermedad puede ocurrir un solapamiento entre diferentes síndromes ya que las diferencias entre atrofia frontal y temporal comienzan a ser más difusas (Kertesz, *et al.*, 2005).

2.1. Demencia Frontotemporal variante conductual (DFT-vc)

Constituye el síndrome clínico más frecuente y se caracteriza por la aparición precoz (en los primeros 3 años) de cambios bruscos en la personalidad y conducta que suelen ir acompañados de apatía y desinhibición. La enfermedad suele aparecer alrededor de los 58 años (Johnson, *et al.*, 2005) aunque es frecuente que el comienzo de la clínica sea difícil de precisar, ya que estos pacientes presentan una baja capacidad de introspección y la detección de los primeros síntomas depende del grado de observación de familiares y cuidadores.

En las primeras etapas de la enfermedad, los pacientes no muestran signos de alteración en la memoria o en el lenguaje (Ikeda, *et al.*, 2002, Liu, *et al.*, 2004, Mendez, *et al.*, 2005, Miller, *et al.*, 1997, Miller, *et al.*, 2001) aunque sí se ha descrito que la mitad de

los individuos diagnosticados de DFT-vc pueden presentar sintomatología motora, lo que muestra un solapamiento entre la DFT y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) (Lomen-Hoerth, *et al.*, 2002).

Los pacientes presentan atrofia de los lóbulos frontal y temporal anterior. Se distinguen 3 subtipos clínicos en función de las áreas prefrontales afectadas: dorsolateral (disecutivo, pseudodepresivo o de la convexidad), orbitomedial (desinhibido, pseudomaniaco o pseudopsicopático) y mediofrontal (apático, hipocinético o de la circunvolución cingulada) (Mega y Cummings, 1994, Serra-Mestres, 2001) .

2.2. Demencia Semántica (DS)

Los pacientes presentan alteraciones en el lenguaje y la memoria semántica, por lo que los individuos afectados son incapaces de reconocer objetos, hechos y palabras o su significado. Dado que los aspectos fonológicos y sintácticos permanecen intactos, se produce un lenguaje espontáneo fluente pero con escaso contenido informativo acompañado de un déficit tanto en la nominación como en la comprensión (Rosen, *et al.*, 2006, S. O'Neill, 2006).

La DS suele ir asociada a la atrofia del lóbulo temporal (Hodges, *et al.*, 1992) y la presentación clínica varía en función de que parte del lóbulo esté atrofiado. Los pacientes que presentan predominantemente atrofia del lóbulo izquierdo se caracterizan por tener trastornos de lenguaje sin afectación de la memoria, sin embargo cuando la atrofia predominante es en la parte derecha del lóbulo temporal, los síntomas iniciales son trastornos de conducta que hacen que en algunos casos pueda confundirse con DFT-vc (Seeley, *et al.*, 2005, Thompson, *et al.*, 2003), estos pacientes desarrollan las características de pérdida semántica unos 3 años después de la aparición de la enfermedad, probablemente porque la degeneración se va extendiendo de un lóbulo temporal a otro.

2.3. Afasia primaria progresiva no fluente (APPNF)

Los pacientes presentan un deterioro del lenguaje expresivo (alteración de los aspectos fonológicos y sintácticos) asociado con la atrofia del opérculo frontal izquierdo, las áreas motora y premotora del cerebro y la ínsula anterior (Gorno-Tempini, *et al.*, 2004, Josephs, *et al.*, 2012). Se observan alteraciones en la fluidez de la conversación aunque la comprensión se conserva en las fases iniciales de la enfermedad (Matias-Guiu y Garcia-Ramos, 2013). De forma típica, el trastorno progresivo del lenguaje constituye la única manifestación durante los primeros dos años, posteriormente pueden aparecer alteraciones en la memoria y la conducta aunque de forma menos frecuente que en la DFT-vc y la DS. En un examen neurológico elemental se pueden observar similitudes con el Síndrome Corticobasal (SCB) y la Parálisis Supranuclear Progresiva (PSP). En la mayoría de los casos, la APPNF está asociada a mutaciones en genes presentes en el cromosoma 17, como los genes que codifican para la proteína tau asociada a microtúbulos (*MAPT*) o la progranulina (*GRN*) (Mesulam, *et al.*, 2007, Snowden, *et al.*, 2006).

2.4. Síndromes Secundarios

Además de los síndromes clínicos principales, el espectro clínico de la DFT incluye otras enfermedades como el Síndrome Corticobasal (SCB), la Parálisis Supranuclear Progresiva (PSP), la Gliosis Subcortical Progresiva (GSP), la demencia frontotemporal asociada a motoneuronas (DFT-EMN), la enfermedad de Pick y la Demencia Frontotemporal y Parkinsonismo ligada al cromosoma 17 (DFTP-17) entre otras (Galan, *et al.*, 2011, Sagarra Mur y Olivan Usieto, 2010).

3

Clasificación Histopatológica

La principal anomalía patológica observada en el cerebro de pacientes de DLFT es la atrofia de los lóbulos frontal y temporal acompañada de una relativa conservación de las partes posteriores del cerebro hasta etapas avanzadas de la enfermedad (Brun y Pas-sant, 1996, Short, *et al.*, 2005). Además, a nivel histopatológico se observan agregados anómalos de proteínas en el citoplasma o núcleo de las células afectadas (neuronas o glía) (Trojanowski y Dickson, 2001) (Figura 2).

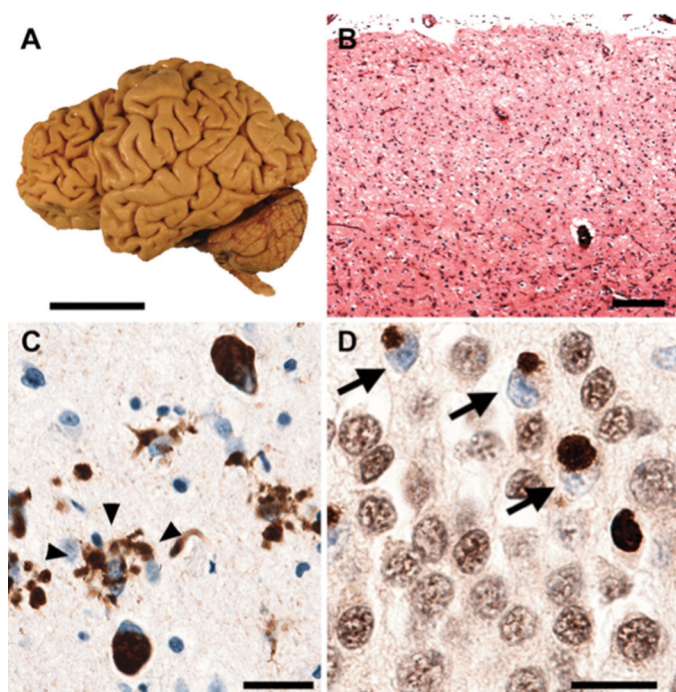


Fig. 2: Características patológicas de la DLFT. **A)** Atrofia de la región cortical y subcortical en un paciente de APPNF. Barra de escala=5 cm. **B)** Marcaje del tejido cerebral con hematoxilina/eosina. Se observa pérdida neuronal, gliosis y microvacuolación, especialmente en las capas corticales superiores. Barra de escala=200 micras. **C)** Inclusiones citoplasmáticas de la proteína tau y astrogliosis ramificada (puntas de flecha) en un paciente diagnosticado de enfermedad de Pick. **D)** Inclusiones citoplasmáticas de la proteína TDP-43 en las neuronas y giro dentado de una paciente de DLFT-TDP. Barra de escala= 25 micras. Tomado de (Rabinovici y Miller, 2010).

Los recientes avances en la neuropatología han permitido definir una nueva clasificación histopatológica de la DLFT apenas solapada con diagnósticos clínicos. Según Mackenzie y colaboradores (Mackenzie, *et al.*, 2011a, Mackenzie, *et al.*, 2009, Mackenzie, *et al.*, 2010) todos los casos de DLFT pueden ser clasificados dentro 4 categorías principales en función de la proteína predominante que se encuentra en las inclusiones presentes en las células afectadas.

3.1. DLFT con marcaje positivo para la proteína tau (DLFT-TAU)

El cerebro de los pacientes presenta agregados insolubles intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada (Mackenzie, *et al.*, 2009). En condiciones normales, tau es una proteína soluble presente en todas las células nucleadas. Esta proteína está codificada por el gen *MAPT* y su función principal es la estabilización de los microtúbulos. Cuando tau es anormalmente hiperfosforilada, pierde su actividad biológica, se disocia de los microtúbulos, se hace resistente a la degradación y se inducen cambios que la hacen insoluble para finalmente formar los agregados propios de las taupatías.

Las inclusiones de tau pueden aparecer tanto en las formas esporádicas como hereditarias de la enfermedad (Yancopoulou y Spillantini, 2003). En las formas esporádicas, estos agregados se forman como consecuencia de una variante polimórfica del gen *MAPT*. Este polimorfismo es una de las causas principales de SCB, PSP así como de otras enfermedades neurodegenerativas como párkinson y alzhéimer (Baker, *et al.*, 1999, Houlden, *et al.*, 2001, Kwok, *et al.*, 2004, Myers, *et al.*, 2007, Rademakers, *et al.*, 2005). En la DLFT de tipo familiar, los agregados de tau son consecuencia de mutaciones puntuales en el gen *MAPT* que pueden dar lugar a diferentes síndromes clínicos primarios como la DS o la DFT-vc y secundarios como el SCB, la PSP, la enfermedad de Pick y DFTP-17 (Hutton, *et al.*, 1998, Spillantini y Goedert, 2013, Spillantini, *et al.*, 1998).

3.2. DLFT con marcaje positivo para la proteína TDP-43 (DLFT-TDP)

En el año 2006 se identificó que la proteína TDP-43 (*TARDNA-Binding Protein 43*) era el componente principal de las inclusiones intracelulares tau-negativas y ubiquitin-positivas que se encuentran en el hipocampo, neocórtex y médula espinal de algunos pacientes de DLFT (Grossman, *et al.*, 2007b, Neumann, *et al.*, 2006).

TDP-43 es una proteína de 414 aminoácidos, con un peso molecular de 43 kDa, codificada por el gen *TARDBP* (*TARDNA-Binding Protein*) que se encuentra en el cromosoma 1 (Ou, *et al.*, 1995). Esta proteína se identificó por primera vez asociada a las secuencias terminales repetidas largas (LTR, del inglés *Long Terminal Repeat*) del virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) (Ou, *et al.*, 1995). Por su estructura, TDP-43 pertenece al grupo de las proteínas ribonucleares heterogéneas (hnRNPs, del inglés *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) (Dreyfuss, *et al.*, 1993), concretamente a la subclase de las proteínas 2xRBD-Gly (*2-RNA-binding domain Glycine*). Se ha descrito que esta proteína tiene un dominio carboxilo-terminal (C-terminal) rico en glicinas necesario para algunas de las funciones mejor caracterizadas de la proteína como el *splicing* (Ayala, *et al.*, 2005) y dos dominios de unión a ARN (RBDs por sus siglas en inglés, *RNA-binding domain*) muy conservados evolutivamente (Wang, *et al.*, 2004).

En condiciones fisiológicas, TDP-43 es una proteína predominantemente nuclear, altamente conservada y de expresión ubicua (Ayala, *et al.*, 2008b, Wang, *et al.*, 2002) cuya función principal es la regulación de la expresión génica a través de su capacidad de unirse tanto a ADN como a ARN (Buratti y Baralle, 2008). TDP-43 es la encargada de la regulación del proceso de *splicing* (Boyault, *et al.*, 2007, Mercado, *et al.*, 2005, Wang, *et al.*, 2004) y la estabilización de los ARN mensajeros que codifican para proteínas involucradas en el desarrollo, plasticidad sináptica y neurodegeneración (Belly, *et al.*, 2005, Strong, *et al.*, 2007, Wang, *et al.*, 2008), por otro lado, también está involucrada en el procesamiento de micro ARN (miARN) (Kawahara y Mieda-Sato, 2012) y en la estabilidad del genoma (Ayala, *et al.*, 2008a, Baechtold, *et al.*, 1999, Warraich, *et al.*, 2010). En su forma patológica, TDP-

43 se encuentra anormalmente fosforilada, ubiquitinada, cortada en fragmentos C-terminales de 25KDa de peso molecular y formando agregados insolubles en el citoplasma de las células afectadas (Arai, *et al.*, 2010, Buratti y Baralle, 2008, Hasegawa, *et al.*, 2008, Kwong, *et al.*, 2007, Neumann, *et al.*, 2006, Neumann, *et al.*, 2009b) (Fig.3).

Hasta el momento no se sabe muy bien por qué se forman los agregados de TDP-43 patológica, se piensa que la hiperfosforilación hace a la proteína insoluble (Igaz, *et al.*, 2009, Neumann, *et al.*, 2006) aunque no parece necesaria para su posterior corte, agregación y toxicidad (Y.J. Zhang, *et al.*, 2009). Tampoco está claro que el corte por caspasas sea esencial para la formación de las inclusiones neuronales (Johnson, *et al.*, 2008, Y.J. Zhang, *et al.*, 2009), aunque sí que hay bastantes evidencias que muestran que el dominio rico en glicinas de la TDP-43 podría ser básico para su agregación (D'Ambrogio, *et al.*, 2009).

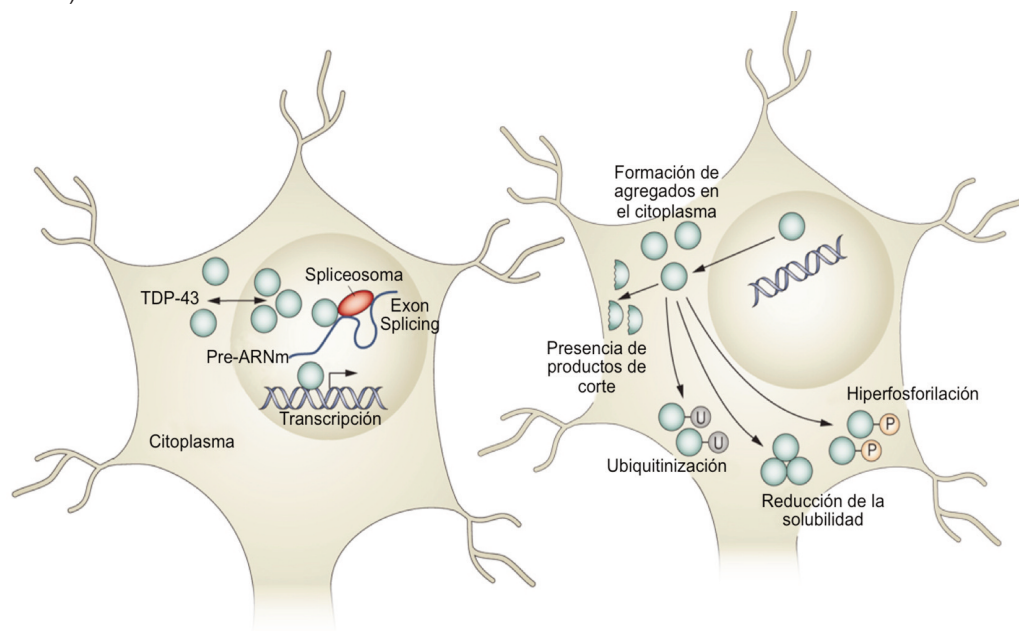


Fig. 3: Características fisiológicas y patológicas de TDP-43: A) En condiciones fisiológicas, TDP-43 reside prioritariamente en núcleo y tiene un papel importante en la regulación de la expresión génica. B) En condiciones patológicas, TDP-43 sale del compartimento nuclear y se acumula en el citoplasma. En este caso la proteína se encuentra ubiquitinizada, hiperfosforilada y cortada en fragmentos C-terminales. Además se ha demostrado que es menos soluble que en condiciones fisiológicas y más propensa a la formación de agregados. Adaptado de (Chen-plotkin, *et al.*, 2010)

En la mayor parte de los casos, la patología de TDP-43 suele ir asociada a mutaciones en el gen *GRN* (Josephs, *et al.*, 2007, Mackenzie, *et al.*, 2006b), aunque también se encuentran inclusiones de TDP-43 en formas esporádicas de DLFT y asociadas mutaciones menos comunes en otros genes como *VCP* (del inglés *Valosin-containing protein*), *CHMP2B* (del inglés *chromatin-modifying protein 2B*), *C9ORF72* (del inglés *chromosome 9 open reading frame 72*) e incluso a el propio gen *TARDBP* que codifica para TDP-43 (Barmada y Finkbeiner, 2010, Cairns, *et al.*, 2007b, Gitcho, *et al.*, 2009a, Mackenzie, *et al.*, 2013, Neumann, *et al.*, 2007b, Neumann, *et al.*, 2006). Los síndromes clínicos asociados a las formas familiares de la enfermedad son la DFT-vc, SCB y DS. En los casos esporádicos, la patología de la TDP-43 se suele encontrar asociada a la DFT-EMN aunque también se han encontrado inclusiones de TDP-43 en las neuronas motoras de hasta un 10% de los casos de DLFT en los que no había síntomas clínicos de EMN (Dickson, 2008). Es muy común encontrar inclusiones de TDP-43 en otros síndromes clínicos relacionados con la DLFT como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), normalmente asociadas a mutaciones en el gen que codifica para TDP-43 (*TARDBP*), y en algunos casos de Esclerosis Lateral Primaria. Por otro lado, la patología de la TDP-43 parece ser una marca secundaria de algunas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Xu, *et al.*, 2013), la enfermedad de Parkinson (EP) (Rayaprolu, *et al.*, 2013) y la enfermedad de Huntington (Tauffenberger, *et al.*, 2013).

Debido a la publicación simultánea de dos trabajos que describían la heterogeneidad patogénica en casos de DLFT asociada a inclusiones ubiquitin-positivas y tau-negativas (Mackenzie, *et al.*, 2006a, Sampathu, *et al.*, 2006) se generaron dos sistemas diferentes de clasificación de la DLFT asociada a inclusiones de TDP-43 (DLFT-U/DLFT-TDP) que eran usados de modo indiferente. Recientemente se ha propuesto el uso de un solo sistema (Mackenzie, *et al.*, 2011a) armonizando las dos clasificaciones que hasta entonces estaban en uso (Tabla 1). Según esta clasificación existen cuatro subtipos diferentes de DLFT-TDP: A, B, C y D (Figura 4). El Tipo A se caracteriza por numerosas neuritas distróficas y la presencia de inclusiones neuronales citoplasmáticas e intranucleares normalmente asociadas

a mutaciones en *GRN* (Josephs, et al., 2007,Mackenzie, et al., 2006b,Mackenzie, et al., 2010). El Tipo B se caracteriza por la presencia de un número moderado de inclusiones citoplasmáticas neuronales y muy pocas neuritas distróficas. El tipo C muestra una predominancia de neuritas distróficas y muy pocas inclusiones citoplasmáticas neuronales. Finalmente, el Tipo D se refiere a la patología asociada con IBMPFD o Enfermedad de Paget (del inglés, *Inclusion Body Myopathy with Paget Disease*) causada por mutaciones en el gen *VCP* caracterizada por numerosas neuritas distróficas y la presencia de frecuentes inclusiones lentiformes intranucleares y relativamente escasas inclusiones citoplasmáticas (Neumann, et al., 2006).

Tabla 1: Sistema de clasificación para la DLFT-TDP (Mackenzie, et al., 2011a)

Sistema Nuevo	(Mackenzie, et al., 2006b)	(Sampathu, et al., 2006)	Síndrome clínico	Defectos Genéticos Asociados
Tipo A	Tipo 1	Tipo 3	DFT-vc APPNF	Mutaciones en GRN
Tipo B	Tipo 3	Tipo 2	DFT-vc DFT-EMN	Asociado al cromosoma 9
Tipo C	Tipo 2	Tipo 1	DS DFT-vc	-
Tipo D	Tipo 4	Tipo 4	IBMPFD	Mutaciones en VCP

DFT-vc: Variable comportamental de la DLFT, DFT-EMN: Demencia frontotemporal asociada a enfermedad de la motoneurona, DS: Demencia semántica, IBMPFD: Miopatía con cuerpos de inclusión asociada a la enfermedad de Paget y demencia frontotemporal (inclusion body myopathy with paget´s disease of bone and frontoemporal dementia), GRN: Gen progranulina, VCP: Gen Valosin containing protein

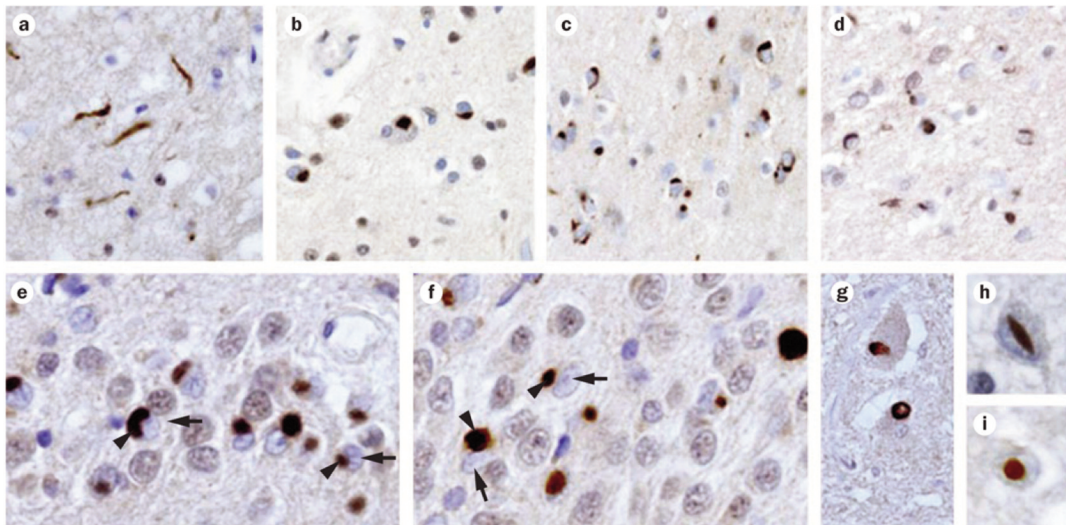


Fig. 4. Histopatología de la TDP-43: La inmunohistoquímica usando anticuerpos anti-TDP-43 revela un marcaje de TDP-43 dentro de las inclusiones ubiquitinizadas (marcaje marrón). La patología de TDP-43 en la DLFT-TDP puede ser clasificado en diferentes subtipos. **A)** Patología de Tipo A, **B)** Patología de Tipo C **C,D)** Patología de Tipo B en neuronas corticales **E,F)** Inmunohistoquímica mostrando las inclusiones citoplasmáticas de TDP-43 (cabezas de flecha) y la pérdida nuclear (flechas) en neuronas del giro dentado del hipocampo. Otras morfologías de la histopatología de TDP-43 incluyen **G)** inclusiones intranucleares **H)** Inclusiones lentiformes **I)** Inclusiones circulares en las motoneuronas de la médula espinal. Tomado de (Neumann, et al., 2006).

3.3. DLFT con marcaje positivo para la proteína FUS (DLFT-FUS)

En un 5-20% de los casos de DLFT, las células afectadas presentan inclusiones tau/TDP-43 negativas cuyo principal componente es la proteína de unión a ADN/ARN *Fused in Sarcoma* (FUS) (Mackenzie, et al., 2011b, Neumann, et al., 2009a). En condiciones normales esta proteína se expresa de forma ubicua y su principal función es la regulación de la expresión génica. Se ha descrito que translocaciones cromosómicas del gen *FUS* llevan a la formación de sarcomas (Kwiatkowski, et al., 2009, Lagier-Tourenne y Cleveland, 2009) y que las mutaciones en este gen están asociadas a formas familiares de ELA (Kwiatkowski, et al., 2009), mientras que los casos de DLFT-FUS son en su mayoría esporádicos.

El fenotipo clínico asociado a la patología de FUS se caracteriza por una aparición muy temprana de la enfermedad (sobre los 38 años de edad), cambios en el comportamiento y la atrofia del núcleo caudado (Neumann, *et al.*, 2009a, Seelaar, *et al.*, 2010). Las inclusiones de FUS son similares en morfología y distribución a las de TDP-43, aunque al contrario que en DLFT-TDP una pequeña parte de FUS nuclear permanece en las neuronas afectadas.

3.4. DLFT con marcaje positivo para Proteínas Ubiquitinizadas del Sistema de Proteasoma (UPS de Ubiquitin Proteasome System) (DLFT-UPS)

La DLFT-UPS engloba un pequeño número de casos con inclusiones tau/TDP-43/FUS negativas que reacciona inmunohistoquímicamente con proteínas ubiquitinadas del proteasoma (Urwin, *et al.*, 2010). La presentación clínica más comúnmente asociada a la DLFT-UPS es la DLFT ligada al cromosoma 3 causada por mutaciones en el gen *CHMP2B* (Holm, *et al.*, 2007, Holm, *et al.*, 2009). Se ha planteado la posibilidad de que estas inclusiones tengan una composición heterogénea resultante de defectos en la función endosomal de las células afectadas (Urwin, *et al.*, 2009).

3.5. DLFT no asociada a inclusiones (DLFT-ni)

En una pequeña parte de los pacientes de DLFT no se aprecian inclusiones visibles de ninguna proteína en las células afectadas (Giannakopoulos, *et al.*, 1995) y por eso se ha designado a este subtipo como DLFT no asociada a inclusiones (DLFT-ni).

4

Genética de la enfermedad

Aproximadamente, entre el 40 y el 50% de los casos de Demencia Lobar Frontotemporal (DLFT) presentan un historial familiar de la enfermedad (See, *et al.*, 2010), de los cuales, alrededor de un 10% muestran una herencia autosómica dominante (Goldman, *et al.*, 2007, Rademakers, *et al.*, 2012, Sieben, *et al.*, 2012).

Las características neuropatológicas de las variantes hereditarias de la enfermedad son similares a las de formas esporádicas siendo algunas de las más comunes la presencia de inclusiones neuronales y gliales de tau (DLFT-TAU) (McKhann, *et al.*, 2001) y de TDP-43 (DLFT-TDP) (Cairns, *et al.*, 2007b), aunque también hay algunos casos en los que la enfermedad puede no estar asociada a ningún rasgo patológico distintivo (DLFT-ni) (Mackenzie, *et al.*, 2006c).

Los fenotipos clínicos más frecuentemente asociados a formas familiares de DLFT son la DFT-vc y la DLFT con características de ELA (DLFT-ELA), sin embargo las formas familiares de DLFT son menos comunes en pacientes diagnosticados de DS.

Hasta la fecha se han descrito varios genes que están implicados en la etiología de la DLFT. La mayoría de los casos de DLFT familiar están asociados a mutaciones en dos genes situados en el cromosoma 17q21, el gen *MAPT* (del inglés *Microtubule associated protein tau*) (Poorkaj, *et al.*, 1998, Spillantini, *et al.*, 1998) y el gen *progranulina* (*GRN*) (Baker, *et al.*, 2006, Cruts, *et al.*, 2006) (Fig.4). Además, aunque de forma menos numerosa, también se han identificado mutaciones asociadas a la DLFT en otros genes como *TARDBP* (Gitcho, *et al.*, 2009a), *CHMP2B* (Holm, *et al.*, 2007), *VCP* (Watts, *et al.*, 2004) y *C9ORF72* (DeJesus-Hernandez, *et al.*, 2011). Cada año aparecen nuevos genes relacionados con la DLFT por lo que es fácil pensar que el número de genes conocidos que se relacionan con la aparición de la enfermedad va a ir en aumento. En este sentido, recientemente se han identificado mutaciones raras asociadas a DLFT y ELA en el gen *sequestome-1* (*SQSTM1*) (Le Ber, *et al.*, 2013), *Ubiquilin 2* (*UBQLN2*) (Deng, *et al.*, 2011, Vengoechea, *et al.*, 2013a) y *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1* (*hnRNPA2B1*) (H.J. Kim, *et al.*, 2013).

4.1. DLFT asociada a mutaciones en MAPT

Las primeras mutaciones asociadas a formas familiares de DLFT se descubrieron en el año 1998 en el gen *MAPT* (Poorkaj, et al., 1998, Spillantini, et al., 1998) que codifica para la proteína tau. En las neuronas, esta proteína es la encargada del ensamblaje y estabilización de los microtúbulos axonales. La estructura de tau se caracteriza por la presencia de una zona de unión a los microtúbulos (Lee, et al., 1989, Trinczek, et al., 1995) flanqueada por un fragmento C-terminal y otro N-terminal. La región mejor caracterizada es la de unión a los microtúbulos que se encuentra codificada por el exón 10. Se ha descrito que mediante un proceso del splicing del ARN mensajero, se generan seis isoformas de tau que se diferencian entre sí por el número de repeticiones de una secuencia de aminoácidos en la región encargada de unirse a los microtúbulos, 4R (cuatro repeticiones) y 3R (tres repeticiones) (Himmler, 1989) (Fig. 5B).

Hasta la fecha se han descrito alrededor de 37 mutaciones en *MAPT* asociadas con la DLFT que, independientemente de su naturaleza, llevan al desensamblaje de tau de los microtúbulos, su fosforilación y posterior agregación (*Alzheimer disease and frontotemporal dementia mutation database*, www.molgen.ua.ac.be/FTDMutations) (Goedert y Jakes, 2005, Wolfe, 2009). La mayoría de las mutaciones producen anomalías en el *splicing* del exón 10 del dominio de unión a los microtúbulos variando la proporción entre las isoformas 3R/4R de la proteína (D'Souza, et al., 1999, Stanford, et al., 2003). Aunque de modo menos frecuente, también hay mutaciones asociadas a la DLFT fuera del dominio de unión a los microtúbulos, por ejemplo mutaciones que producen la pérdida del fragmento C-terminal de tau y que promueven la inestabilidad de los microtúbulos, o una mutación en la región N-terminal que impide el transporte intracelular neuronal debido a que tau pierde su capacidad de unión a la subunidad p150 del complejo de dinactina (Magnani, et al., 2007). Además, se han descrito algunas mutaciones sin sentido (Alonso Adel, et al., 2004) o que impiden la unión de tau a la principal fosfatasa del cerebro (fosfatasa 2A) (Goedert, et al., 2000) que podrían ser responsables de la hiperfosforilación que induce a tau a asociarse formando filamentos (Alonso, et al., 2001).

Las mutaciones en *MAPT* tienen una alta penetrancia y sitúan el comienzo de los síntomas de la DLFT entre los 40 y 60 años (media de 55 años), estimándose una duración de la enfermedad de 8 a 10 años (Goldman, *et al.*, 2007). Los portadores de la mutación pueden presentar déficits cognitivos décadas antes de la aparición de la demencia, sugiriendo un posible trastorno en el desarrollo del SNC (Geschwind, *et al.*, 2001). El fenotipo clínico asociado a las mutaciones en *MAPT* es variable, incluyendo DFT-vc, DS, APPNF, SCB, PSP, enfermedad de Pick y son responsables del 13% de los casos de DFTP-17 (D'Souza, *et al.*, 1999, Hogg, *et al.*, 2003, Hutton, *et al.*, 1998, Pickering-Brown, *et al.*, 2004, Spillantini y Goedert, 2013, Spillantini, *et al.*, 1998, Wilhelmsen, *et al.*, 1994).

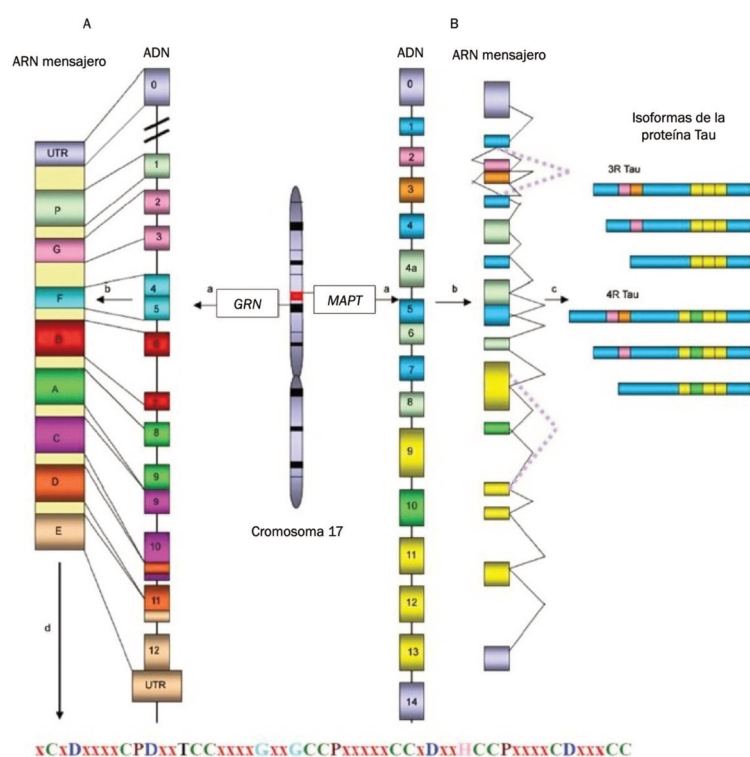


Fig. 5. Representación esquemática de la localización cromosómica, y estructuras genómica y proteica de los genes *GRN* y *MAPT*. Ambos genes se localizan muy cerca uno de otro en el cromosoma 17 **A)** La estructura del gen *GRN* consiste en 12 exones codificantes y uno no codificante. **B)** El gen *MAPT* está formado por 14 exones que codifican para la 6 isoformas diferentes de la proteína tau generadas por el proceso de *splicing* del ARN mensajero que varían entre si por el número de repeticiones que contienen en los motivos de unión a los microtubulos. Adaptado de (Aswathy, *et al.*, 2010)

4.2. DLFT asociada a mutaciones en GRN

La progranulina (PGRN), también conocida como precursor de granulina-epitelina, proepitelina o acrogranina (Bateman, et al., 1990, Bhandari y Bateman, 1992, Shoyab, et al., 1990) es un precursor proteico de 68 KDa de peso molecular que es secretado en su forma glicosilada de 88KDa y cortado de forma específica por la elastasa para generar unos péptidos ricos en cisteínas de 6KDa de peso molecular llamados granulinas (GRN) (He y Bateman, 2003). En condiciones normales existe un balance entre la PGRN completa y los péptidos de GRN que es mantenido por la acción del inhibidor de la proteasa secretora de leucocitos (SLPI de sus siglas en inglés *Secretory Leukocyte protease inhibitor*) que se encarga de inhibir la acción proteolítica de la elastasa (Zhu, et al., 2002) (Fig. 6).

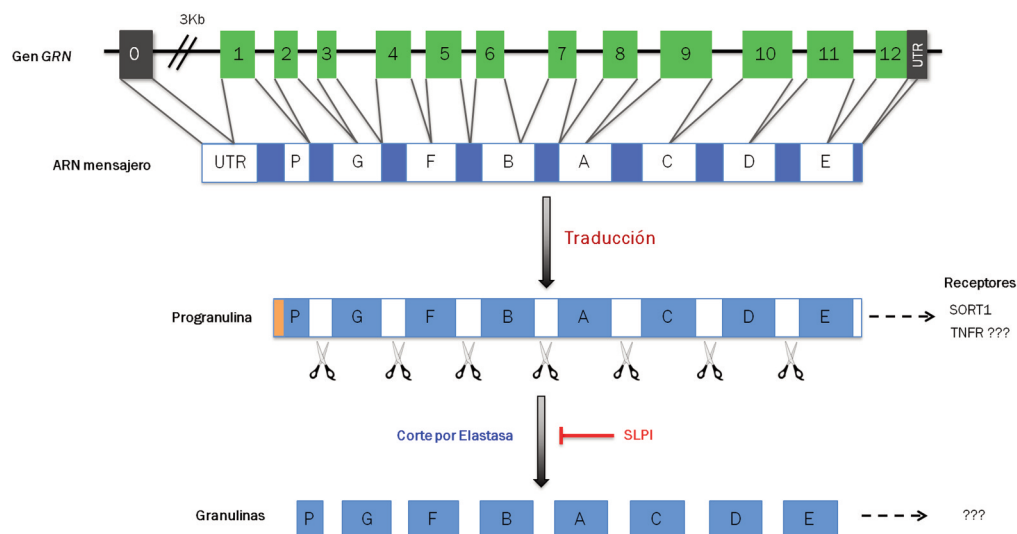


Fig. 6. Representación esquemática del gen GRN, ARN mensajero y la PGRN: El gen GRN consiste en 12 exones que se transcriben a ARN mensajero de un modo en el que cada dominio granulina va a ser codificado por dos exones distintos del gen GRN. Después de la traducción se produce un precursor de PGRN formada por una secuencia señal (naranja), necesaria para la secreción, seguida por 7.5 repeticiones en tándem de 12 motivos ricos en cisteínas separados por secuencias unión que se cortaran por la elastasa para generar las granulinas maduras. SLPI inhibe la acción proteolítica de la elastasa.

Como se muestra en la figura 5A, la PGRN se encuentra codificada por un único gen (*GRN*) localizado en el cromosoma 17q21, muy cerca del gen *MAPT*. La región codificadora del gen *GRN* se extiende a lo largo de 3700 y está formada por 12 exones codificantes separados por 11 pequeños intrones. Cada uno de los dominios granulina ricos en cisteína que forman la PGRN completa se encuentran codificados por dos exones no equivalentes que van a dar lugar a cada una de las granulinas maduras (Bhandari y Bateman, 1992)

Desde el año 2006, en el que se describió por primera vez que las mutaciones en *progranulina* (*GRN*) eran una causa de la DLFT (Baker, *et al.*, 2006, Cruts, *et al.*, 2006, Mackenzie, *et al.*, 2006b), se han descrito 69 mutaciones patogénicas diferentes asociadas a la enfermedad, identificadas en 231 familias en todo el mundo, que representan alrededor del 16% de los afectados de DLFT (Alzheimer disease and frontotemporal dementia mutation database, www.molgen.ua.ac.be/FTDMutations) (Gijssels, *et al.*, 2008). Las mutaciones en *GRN* pueden ser de diferentes tipos entre los que se incluyen mutaciones de desfase del marco de lectura (*frameshift* en inglés), mutaciones que afectan al correcto *splicing* del ARN mensajero, mutaciones sin sentido (*nonsense* en inglés), mutaciones en el péptido señal, mutaciones que provocan alteraciones en la secuencia Kozak del ARN mensajero y mutaciones de cambio de sentido (*missense* en inglés) (Gass, *et al.*, 2006) (Fig. 7 y 8). Independientemente del mecanismo, la mayoría de las mutaciones descritas hasta la fecha se encuentran en heterocigosis y resultan en la aparición de un codón terminación prematuro en el ARN mensajero del alelo mutante llevando a la rápida degradación de éste mediante el proceso de NMD (*nonsense mediated decay*). El resultado final es por tanto la pérdida del 50% de la proteína, siendo así la haploinsuficiencia de PGRN el mecanismo que causa la enfermedad (Baker, *et al.*, 2006, Cruts, *et al.*, 2006, Gass, *et al.*, 2006, Gijssels, *et al.*, 2008, Le Ber, *et al.*, 2007, Mukherjee, *et al.*, 2008, Yu, *et al.*, 2010). Por otro lado, algunas mutaciones patogénicas, como por ejemplo las mutaciones sin sentido (*missense*) generan una proteína no funcional o inestable sin producir un alelo nulo, por lo tanto, parece que estas mutaciones causan la enfermedad por un mecanismo de

haploinsuficiencia funcional (van der Zee, *et al.*, 2007). Además de las mutaciones asociadas a la DLFT, se han descrito otras mutaciones en *GRN* cuyo papel en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas es todavía desconocido (Rademakers y Rovelet-Lecrux, 2009), se postula que muchas de esas mutaciones no son patogénicas o que podrían causar otras enfermedades neurodegenerativas como EA (Bernardi, *et al.*, 2009, Sleegers, *et al.*, 2010) En las figuras 7 y 8 se muestra esquemáticamente las mutaciones codificantes y no codificantes en *GRN* descritas hasta la fecha.

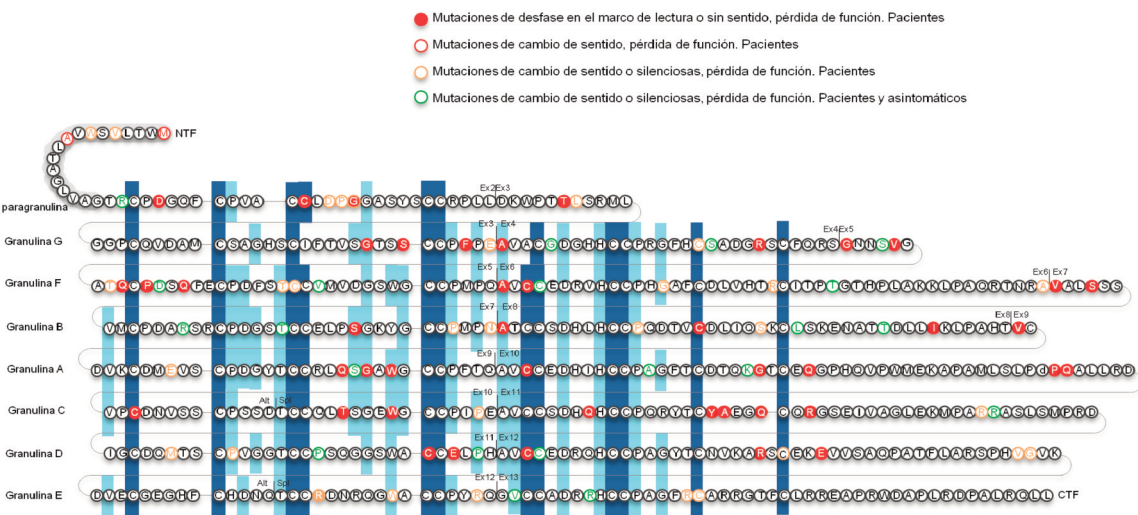


Fig. 7: Representación esquemática de la PGRN mostrando las mutaciones codificantes. Los 7,5 dominios granulina se encuentran alineados y conectados uno a otro por los dominios inter-granulinas. El péptido señal se muestra con una sombra gris. Las posiciones respectivas de cada dominio granulina están indicadas a la izquierda de la figura. Los residuos cisteína altamente conservados están indicados por barras verticales azul oscuro mientras que los dominios conservados de otros aminoácidos que no son cisteína están marcados en azul claro. Las uniones exon-exon están marcadas con líneas verticales en sus respectivos residuos. Las mutaciones en *GRN* en las regiones codificantes que afectan a la secuencia de la proteína se muestran coloreadas en sus respectivos aminoácidos tal y como se cita en la leyenda de la figura. Adaptado de (Gijssels, *et al.*, 2008) y Alzheimer disease and frontotemporal dementia mutation database, (www.molgen.ua.ac.be/FTDMutations)

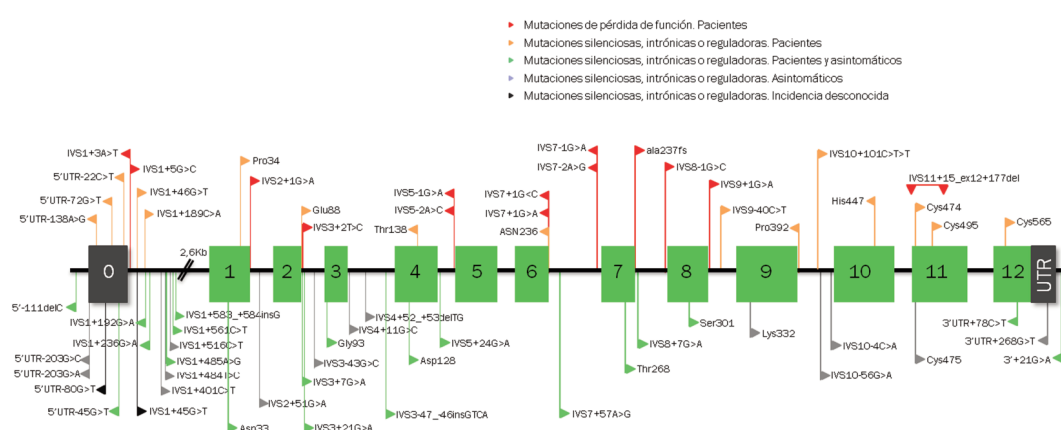


Fig. 8. Representación esquemática del gen *GRN* mostrando las mutaciones no codificantes o silenciosas. Los exones codificantes están indicados en color verde. Las mutaciones están marcadas en diferentes colores tal y como se indica en la leyenda de la figura. Adaptado de (Gijssels, *et al.*, 2008).

En contraste con las mutaciones en *MAPT*, que suelen causar la enfermedad por la ganancia de una función tóxica de tau, las consecuencias patogénicas de las mutaciones en *GRN* se deben probablemente a la pérdida de función de la proteína (Gass, *et al.*, 2006). La PGRN tiene efectos neurotróficos, de modo que la haploinsuficiencia de PGRN puede inducir una respuesta inadecuada al daño neuronal o fallos en la sinapsis de las neuronas de afectadas (Petoukhov, *et al.*, 2013). Aunque la PGRN es una proteína de expresión sistémica, la patología asociada a las mutaciones en este gen está altamente restringida a las neuronas de la corteza frontal y temporal del cerebro (Daniel, *et al.*, 2000), sin embargo, hasta la fecha se desconoce el motivo por el cual las células de la corteza frontal y temporal son más sensibles a la pérdida de PGRN.

En todos los casos de DLFT causada por mutaciones en *GRN* se observan inclusiones citoplasmáticas y agregados intranucleares de la proteína TDP-43 en las neuronas afectadas y en las células de la glía (Eriksen y Mackenzie, 2008, Mackenzie, *et al.*, 2011b) además de pérdida neuronal por astrogliosis y microgliosis. El fenotipo clínico es variable y

no existe una clara correlación genotipo/fenotipo (Le Ber, *et al.*, 2008) siendo algunos de los síndromes más comunes la DFT-vc y SCB y en menos medida APPNF (Gass, *et al.*, 2006). Se ha descrito que el rango de edad de aparición de la enfermedad es muy amplio pudiendo variar entre los 35 y los 89 años. La penetrancia también es variable siendo de alrededor de un 50% en personas menores de 60 años y del 90 % en mayores de 70 (van Swieten y Heutink, 2008). Además de los casos familiares, también se han encontrado mutaciones en *GRN* en 3.2% de casos de DLFT esporádica (Le Ber, *et al.*, 2007), en contraste con las mutaciones en *MAPT* que son extremadamente raras en casos esporádicos de DLFT. Es conveniente destacar que no todos los individuos portadores de mutaciones patológicas en *GRN* desarrollan los síntomas de la DLFT por lo que además de las características patológicas asociadas a las mutaciones en *GRN* debe de haber algún factor ambiental que sea el detonante de la aparición de la enfermedad (Gass, *et al.*, 2006).

4.3 DLFT asociada a mutaciones en VCP

Las mutaciones en el gen *VCP*, localizado en el cromosoma 9p13.3 están ligadas a un síndrome que causa DLFT autosómica dominante asociada con IBMPFD o enfermedad de Paget (Dai y Li, 2001, Watts, *et al.*, 2004). La proteína VCP es una adenosina trifosfatasa que actúa como una chaperona molecular relacionada con múltiples funciones celulares como la degradación de proteínas dependiente de ubiquitina, la regulación del ciclo celular y la apoptosis (Watts, *et al.*, 2004). Muchas de las mutaciones en *VCP* están localizadas dentro o cerca del dominio de unión a ubiquitina (Watts, *et al.*, 2004).

La neuropatología más comúnmente asociada a mutaciones en *VCP* es la presencia de neuritas distróficas y numerosas inclusiones intranucleares cuya proteína mayoritaria es TDP-43 (Forman, *et al.*, 2006, Neumann, *et al.*, 2007b).

4.4. DLFT asociada a mutaciones en *CHMP2B*

El análisis del genoma de una familia danesa con un largo historial de DLFT permitió identificar una mutación compleja en el gen *CHMP2B* situado en el cromosoma 3p11.2 (Skibinski, et al., 2005) que no se ha encontrado en otras formas familiares de DLFT. La proteína codificada por este gen es un componente del complejo secretor endosomal tipo III requerido para el transporte (ESCRTIII, del inglés *Endosomal secretory complex required for transport*) (Momeni, et al., 2006). La mutación consiste en un *splicing* aberrante del exón 6 que da lugar a una proteína truncada (Skibinski, et al., 2005). La disfunción en ESCRTIII da lugar a la presencia de cuerpos endosomales y una reducción del recambio de proteínas (Babst, et al., 2002). La marca patológica de los individuos portadores de la mutación es la presencia de inclusiones intracelulares ubiquitinizadas negativas para TDP-43, posiblemente formadas a partir de los cuerpos endosomales como consecuencia de la alteración en la proteína ESCRTIII, por lo que el subtipo patológico al que pertenecen sería DLFT-UPS (Holm, et al., 2007).

Además de a la DLFT, las mutaciones en *CHMP2B* también están asociadas a ELA y DFT-ELA (Parkinson, et al., 2006).

4.5. DLFT asociada a mutaciones en *C9ORF72*

Recientemente se ha identificado una mutación en *C9ORF72* asociada con DLFT y ELA (DeJesus-Hernandez, et al., 2011). Esta mutación consiste en una repetición expandida de 6 nucleótidos y es considerada una de las principales causas de la DFT-vc y enfermedad de las motoneuronas (EMN) (Benussi, et al., 2013). La penetrancia de esta mutación es muy alta por encima de los 80 años y es casi exclusiva de las formas familiares de la enfermedad. En la DLFT, la patología característica asociada a este tipo de mutaciones es la presencia de inclusiones de TDP-43 en las neuronas afectadas (Mahoney, et al., 2012, Renton, et al., 2011).

4.6. DLFT asociada a mutaciones en *TARDBP*

Aunque las mutaciones en *TARDBP* se asocian más comúnmente a la ELA que a DLFT (Neumann, 2013), se han descrito mutaciones en el gen que codifica para la proteína TDP-43 en individuos diagnosticados de algunos síndromes clínicos secundarios de la enfermedad como la DFT-EMN (Gitcho, *et al.*, 2009a, Kaivorinne, *et al.*, 2012, Yokoseki, *et al.*, 2008) y la demencia semántica (Gelpi, *et al.*, 2013). Además, también se ha descrito una mutación de cambio de sentido en *TARDBP* en un paciente con DLFT-TDP que presentaba cambios en el comportamiento pero no se apreciaban síntomas clínicos de EMN (Kovacs, *et al.*, 2009).

5

Diagnosis de la DLFT

Tradicionalmente se ha considerado a la DLFT un grupo heterogéneo de enfermedades neurodegenerativas en las que resultaba muy complicado establecer una relación entre la presentación clínica y el proceso patológico subyacente, por lo que era imposible deducir la naturaleza de las manifestaciones clínicas a partir del diagnóstico patológico. Actualmente, gracias a los avances en genética molecular y bioquímica se puede aproximar una correlación clínico-patológica y genética que facilita el diagnóstico de la enfermedad. La tabla 2 muestra un resumen de las diferentes presentaciones clínicas de la DLFT relacionándolas con la histopatología de la enfermedad y las mutaciones asociadas.

Tabla 2: Correlación clinico-patológica y genética de la DLFT

Gen	Patología	Síndrome Clínico							
		DFT-vc	APPNF	DS	DFTP-17	DFT-EMN	PSP	SCB	IBMPFD
MAPT	DLFT-TAU	+	+	+	+	(+)	+	+	
TARDBP	DLFT-TDP	(+)			+	+			
GRN	DLFT-TDP	+	+	+	+	+			
C9ORF7	DLFT-TDP	+	+	+	+	+		(+)	
VCP	DLFT-TDP								
CHMP2	DLFT-UPS	+			+				+
FUS (*)	DLFT-FUS	+				+			

(+): Variante rara. (*): Los casos de DLFT-FUS son es su mayoría esporádicos. Las mutaciones en FUS suelen estar asociadas con la ELA.

En el diagnóstico de la DLFT, el primer paso es diferenciar la enfermedad de otros síndromes clínicos con sintomatología parecida como pueden ser perturbaciones metabólicas, deficiencias nutricionales, infecciones del SNC, abuso de sustancias, enfermedad vacuolar, toxicidad de metales pesados y condiciones primarias neoplásicas y paraneoplásicas o de otras enfermedades neurodegenerativas con las que comparte algunos síntomas como EP o ELA. El estudio cuidadoso del historial médico de los individuos permite realizar un diagnóstico primario basándose en unos criterios diagnósticos establecidos que permiten asignar a cada individuo unos síndromes clínicos determinados (Litvan, *et al.*, 2003,McKhann, *et al.*, 2001,Neary, *et al.*, 1998,Rascovsky, *et al.*, 2011). El diagnóstico secundario, más específico, se lleva a cabo mediante técnicas de neuroimagen o el análisis

de biomarcadores específicos de la enfermedad. Los resultados obtenidos mediante el uso de estas técnicas son reproducibles a nivel de grupo pero no siempre se correlacionan con cada paciente individual, es decir, el diagnóstico siempre será aproximado hasta que la evaluación *post mortem* del cerebro de los pacientes aporte datos concretos de las características patológicas de cada individuo.

Un método alternativo para diagnosticar las enfermedades neurodegenerativas es el uso de biopsias del cerebro de los pacientes. Éste método aporta información necesaria para el diagnóstico de la enfermedad *ante mortem*, aunque sólo es útil en una minoría de los casos ya que es un método muy invasivo y peligroso para el paciente.

Debido a las dificultades para realizar un diagnóstico preciso de la enfermedad, existe una necesidad urgente de buscar biomarcadores específicos que puedan ser usados para diagnosticar la DLFT en casos familiares o esporádicos de DLFT de un modo preciso, asequible y poco invasivo para el paciente.

5.1. Criterios Diagnósticos de la DLFT

La heterogeneidad clínica e histopatológica de la DLFT supuso una dificultad para definir unos criterios diagnósticos que facilitaran su clasificación. En 1994, Lund y Manchester (Lund, 1994) elaboraron los primeros criterios clínico-patológicos cuya principal aportación fue una buena discriminación de la DFT frente a la Enfermedad de Alzheimer (EA). Más tarde, el grupo de Neary (Neary, et al., 1998) estableció unos nuevos criterios donde se definían las características clínicas de los tres síndromes principales de la DFT: Demencia frontotemporal variante frontal (DFT), Afasia Primaria Progresiva No Fluente (APPNF) y la Demencia Semántica (DS). En 2001, Mackhan y colaboradores (McKhann, et al., 2001) establecieron unos criterios más simples aunque presentaban el inconveniente de que no permitían discriminar correctamente la DFT de algunas formas de EA. Los recientes avances en la genética molecular, la bioquímica y la neuropatología han permitido

establecer unos nuevos criterios de diagnosis basados en marcas neuropatológicas de la enfermedad (Cairns, et al., 2007a). En este caso se propone una diferenciación entre las taupatías (DLFT-TAU), a las que se habían asignado unos síndromes clínicos, de las ubiquitinopatías (DLFT-U) caracterizadas por la presencia de inclusiones intracelulares de la proteína TDP43.

El estudio neuropsicológico del paciente usando los criterios de diagnosis establecidos (McKhann, et al., 2001) permite asociar las características fenotípicas del individuo a un síndrome clínico concreto, aunque harán falta otras pruebas más objetivas, como el uso de técnicas de neuroimagen o estudios genéticos (en el caso de DLFT familiar) para poder hacer un diagnóstico más exacto. El problema de los estudios neuropsicológicos es que es difícil realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad ya que normalmente las características fenotípicas en las que se basan como medio de diagnosis son marcas que aparecen en fases avanzadas de la enfermedad.

5.2. Neuroimagen en DLFT

El uso de las técnicas de neuroimagen es de gran ayuda en la diagnosis de la DLFT. Las más usadas son las técnicas de imagen funcional y metabólica como la tomografía por emisión de positrones o PET (*Positron emission tomography*), la tomografía computarizada de emisión monofotónica o SPECT (en inglés *Single Photon Emission Computed Tomography*) y la resonancia magnética de imagen o MRI (por sus siglas en inglés, *Magnetic Resonance Imaging*). La figura 9 muestra algunos ejemplos de imágenes obtenidas mediante estas técnicas.

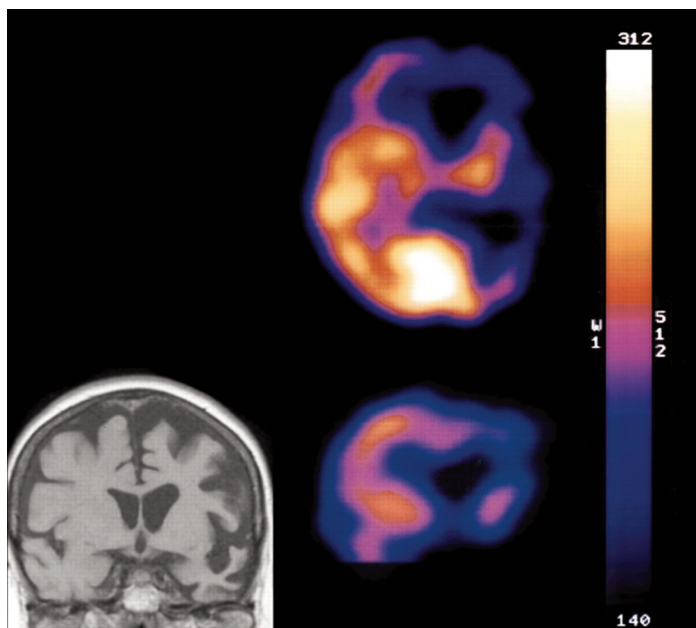


Fig. 9: Imágenes obtenidas mediante las técnicas de neuroimagen en un individuo diagnosticado de DLFT asociada a mutaciones en GRN. La imagen de la izquierda es una sección coronal obtenida por MRI y la de la derecha es una sección transaxial y otra coronal obtenida con el SPECT. Se observa una atrofia asimétrica más predominante en el lóbulo izquierdo del cerebro y baja perfusión en los lóbulos frontal y temporal. Tomado de (Snowden, *et al.*, 2006).

Estas técnicas permiten la identificación de unas marcas anatómicas características desde etapas tempranas de la enfermedad que permiten predecir con bastante precisión el subtipo clínico de la DLFT ya que, como muestra la tabla 3, existe una correlación bastante clara entre la parte del cerebro afectada y el síndrome clínico subyacente (Couto, *et al.*, 2013, Grossman, *et al.*, 2007a). Estas técnicas, además, permiten diferenciar la DLFT de otras enfermedades neurodegenerativas como por ejemplo la EA (Kanda, *et al.*, 2008, Varma, *et al.*, 2002, Y. Zhang, *et al.*, 2009).

Tabla 3: Correlación entre el síndrome clínico y la parte del cerebro afectada en la DLFT

Síndrome Clínico	Parte del cerebro afectada
DFT-vc	Lóbulo frontal y temporal anterior
APPNF	Lóbulo frontal inferior izquierdo, posterior e ínsula
DS	Lóbulo temporal
SCB	Lóbulo premotor (unilateral) y lóbulo parietal
PSP	Gánglio Basal y tronco encefálico
DFT-EMN	Corteza y motoneuronas

DFT-vc: Demencia Frontotemporal variante conductual; APPNF: Afasia Primaria Progresiva No Fluente; DS: Demencia Semántica; SCB: Síndrome Corticobasal; PSP: Parálisis Supranuclear Progresiva; DFT-EMN: Demencia frontotemporal asociada a enfermedad de la motoneurona.

5.3. Marcadores Biológicos en la DLFT

La búsqueda de tratamientos en la DLFT supone la necesidad de desarrollar marcadores biológicos que permitan realizar un diagnóstico lo más exacto posible de la enfermedad.

Un marcador biológico o biomarcador, es un método objetivo de medida que representa un proceso celular normal o patogénico. Para que un biomarcador sea efectivo debe tener una alta sensibilidad y especificidad además de ser fiable, reproducible, simple de analizar y no invasivo. La gran heterogeneidad clínica, patológica y genética de la DLFT dificulta la búsqueda de biomarcadores específicos de la enfermedad.

Actualmente se usan marcadores biológicos del Fluido Cerebroespinal (FCE) que permiten diferenciar la DLFT de otras enfermedades neurodegenerativas como la EA pero no distinguen entre los distintos subtipos clínicos de DLFT. Por ejemplo, los niveles del péptido β -amiloide y de la proteína tau son marcadores específicos de la enfermedad de Alzheimer que permiten diferenciarla de la DLFT (Irwin, et al., 2012). El problema del uso del FCE es que su obtención es demasiado invasiva y molesta para el paciente, por este motivo

se está intentando identificar marcadores biológicos en otros fluidos corporales como por ejemplo en el plasma obtenido a partir de muestras de sangre periférica (Ghidoni, *et al.*, 2013b).

Desde que se conoce que la haploinsuficiencia de PGRN es una de las principales causas de la DLFT-TDP (Baker, *et al.*, 2006, Cruts, *et al.*, 2006), se ha propuesto que los niveles de PGRN en el plasma o FCE podrían usarse como biomarcador en el diagnóstico de la DLFT asociada a mutaciones en *GRN* (Ghidoni, *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha propuesto que la proteína TDP-43 también podría ser un buen marcador biológico para la diagnosis de la DLFT-TDP (Foulds, *et al.*, 2008, Steinacker, *et al.*, 2008), aunque en este caso, al contrario que la PGRN, TDP-43 no es una proteína de secreción, por lo que no es obvio que se vaya a poder detectar en los fluidos periféricos como plasma o FCE.

Finalmente, se ha descrito que otros metabolitos o proteínas relacionadas con la enfermedad también podrían ser biomarcadores que servirían tanto para realizar un correcto diagnóstico de la DLFT así como para diferenciar entre los distintos síndromes de la enfermedad. Algunos de estos biomarcadores podrían ser las Interleuquinas 23 y 179 (IL-23 e IL-179), las alipoproteínas E y B (APOE y APOB), algunas quimioquinas y enzimas que controlan los procesos de inflamación como el inhibidor de la proteasa secretora de leucocitos (SLPI) entre otros (Davidsson, *et al.*, 2002, Ghidoni, *et al.*, 2013a, W.T. Hu, *et al.*, 2010). Recientemente se ha propuesto que algunos micro ARN (ARNmi) presentes en el FCE pueden ser útiles para el diagnóstico de distintas enfermedades neurodegenerativas en estados tempranos del desarrollo de la enfermedad (Sheinerman y Umansky, 2013).

6

Etiopatogénesis de la DLFT

No se sabe mucho acerca de los mecanismos moleculares que contribuyen a la pérdida neuronal en la DLFT. Algunas de las hipótesis más plausibles son una respuesta inflamatoria exacerbada, la disfunción de los mecanismos de supervivencia y proliferación celular, fallos en la degradación de proteínas y el estrés oxidativo, así como la presencia de las inclusiones intracelulares patológicas características de la enfermedad.

6.1. Inflamación como causa de neurodegeneración

Existen numerosas evidencias que relacionan una respuesta inflamatoria exacerbada con la pérdida neuronal característica de diferentes enfermedades neurodegenerativas como el párkinson y la enfermedad de Alzheimer (Akiyama, *et al.*, 2000, Li, *et al.*, 2005).

En cuanto a la DLFT, usando técnicas de neuroimagen como el PET, se ha observado una activación de la microglía en el cerebro de pacientes diagnosticados de diferentes síndromes clínicos relacionados con la enfermedad (Cagnin, *et al.*, 2004). Por ejemplo, se ha descrito que el cerebro de pacientes de DLFT asociada a mutaciones en *GRN* presenta niveles elevados de moléculas (citoquinas y quimioquinas) y células inflamatorias (la microglía y los astrocitos) que podrían estar relacionados con la disminución de los niveles de la proteína. La PGRN es un factor de crecimiento asociado a diferentes procesos biológicos entre los que se encuentra la inflamación, (Bagnoli, *et al.*, 2012, Martens, *et al.*, 2012). Como se ha descrito en apartados anteriores, la PGRN completa es un precursor proteico que, por la acción de la elastasa, es cortado para generar unos péptidos maduros llamados granulinas (GRN). El balance entre PGRN/GRN es fundamental para controlar los procesos de inflamación celular tanto fuera como dentro del SNC (Zhu, *et al.*, 2002) (Fig. 10). En tejidos extraneurales, si este balance se altera en favor de la producción de GRN se desencadena una reacción inflamatoria asociada a liberación de citoquinas y TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*). Sin embargo, la PGRN completa tiene propiedades tróficas que se activan en la reparación de tejidos además de un efecto paracrino que favorecerá el proceso

de epitelización, granulación y vascularización de las heridas. Debido a estas propiedades, si se desregula el balance de PGRN a su favor, se puede desencadenar un proceso de tumorigénesis (Ahmed, *et al.*, 2007). Como se muestra en el panel derecho de la figura 10, en el SNC, las células neuroinflamatorias del cerebro, la microglía, se activan ante cualquier situación que induzca un posible daño neuronal (traumatismos, infecciones). La consecuencia es la liberación de sustancias proinflamatorias así como el incremento de las síntesis de elastasa que favorecerán la producción de GRN en detrimento de la PGRN, incrementando así la inflamación y en última instancia la pérdida neuronal. Si por cualquier motivo la función o la producción de PGRN se ve disminuida (por ejemplo debido a mutaciones que llevan a la haploinsuficiencia de la proteína) también lo hará su efecto inhibitorio sobre la inflamación y se verá favorecido el proceso neurodegenerativo (Ahmed, *et al.*, 2007).

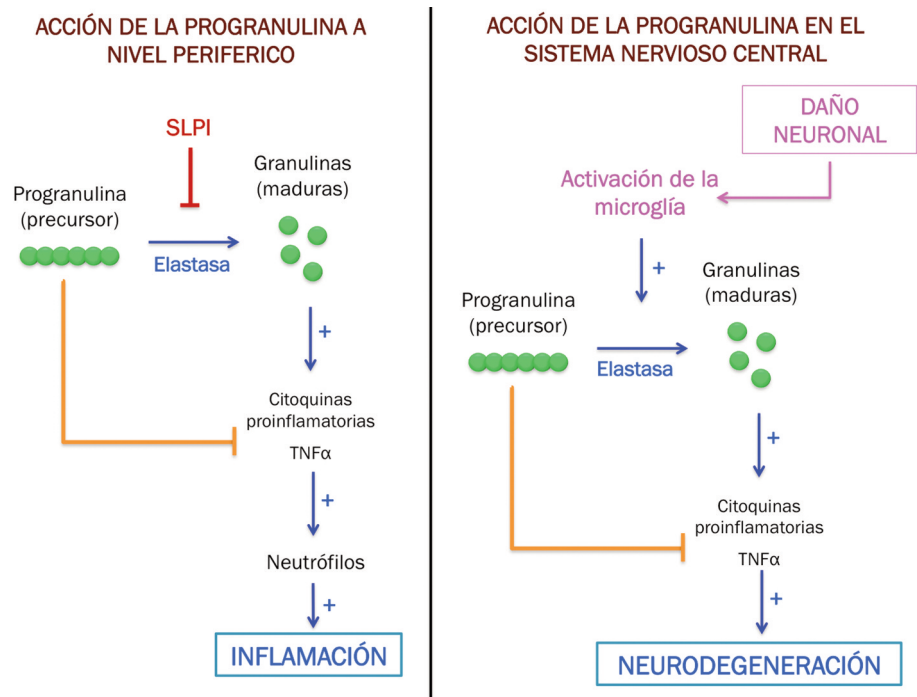


Fig.10. Representación esquemática de la acción de la progranulina dentro y fuera del sistema nervioso central. El balance PGRN/GRN está controlando los procesos inflamatorios tanto fuera como dentro del sistema nervioso central. El incremento del proceso inflamatorio dentro del sistema central lleva a la neurodegeneración.

No se sabe mucho acerca de por qué la PGRN completa y las GRN maduras tienen efectos contrarios. Se postula que se debe a que son capaces de activar diferentes rutas de señalización debido a que se unen a diferentes receptores celulares. Hasta la fecha, no se ha descrito ningún receptor al que se unan las GRN maduras para realizar su función. Puesto que las GRN tienen secuencias homólogas ricas en cisteínas, sería interesante saber si todas se unen al mismo receptor o si existen diferentes receptores para cada una de ellas. En 2010 se identificó que la PGRN completa era capaz de unirse a sortilina 1 (SORT1) a través de tres aminoácidos de su extremo C-terminal (F. Hu, *et al.*, 2010, Zheng, *et al.*, 2011). SORT1 es un receptor multi-ligando tipo I que regula el tráfico intracelular en el Golgi y es capaz de endocitar proteínas del medio extracelular para su procesamiento y/o degradación. Sin embargo, se ha descrito que la PGRN exógena es capaz promover el crecimiento de las neuritas y aumentar la supervivencia en cultivos celulares carentes de sortilina. Este hecho sugiere que SORT1 debe tener un papel limitado a la endocitosis de la PGRN del medio extracelular y su reciclaje, sugiriendo que debe haber algún otro receptor neuronal de la PGRN necesario para su función (Nykjaer y Willnow, 2012). En este sentido, se ha propuesto que la PGRN puede competir con el factor de necrosis tumoral α (TNF α) para unirse a su receptor (TNFR), bloqueando por tanto la iniciación de las cascadas de señalización iniciadas por TNF α (Tang, *et al.*, 2011), sin embargo hay evidencias que demuestran que la PGRN modula la inflamación sin necesidad de unirse al TNFR (Chen, *et al.*, 2013). Se necesitan más estudios para saber si en realidad PGRN es un ligando de TNFR o para encontrar otros receptores a los que la PGRN completa pueda unirse.

Distintas evidencias muestran que la activación de la inflamación también puede asociarse con otras patologías de la DLFT que no están asociadas a mutaciones en GRN, como la DLFT-TAU asociada a mutaciones en MAPT. Por ejemplo, en un estudio realizado usando un modelo de ratón deficiente en una quimioquina neuroprotectora, la CX3CL1-CX3CR1 (Bhaskar, *et al.*, 2010) se demostró que la neuroinflamación contribuye directamente a la patogénesis de la enfermedad y a la aparición de agregados de tau hiperfosforilada. Este trabajo demostró que la señalización a través de la quimioquina

CX3CL1-CX3CR1 o interleuquina-1 podrían ser potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de la DLFT (Bhaskar, *et al.*, 2010).

6.2. Neurodegeneración asociada a inclusiones intracelulares

Una de las características principales de la DLFT es la presencia de agregados de proteínas aberrantes en interior de las neuronas afectadas. Se ha especulado con la posibilidad de que estos agregados pueden estar relacionados con la pérdida neuronal a través de diferentes mecanismos en función de cuál sea su composición proteica.

6.2.1. Pérdida neuronal asociada a inclusiones de tau

Las inclusiones de la proteína tau hiperfosforilada son la marca característica de la DLFT-TAU (Alonso, *et al.*, 2001, Alonso Adel, *et al.*, 2004, Combs y Gamblin, 2012, Johnson y Stoothoff, 2004). Se piensa que los agregados de tau pueden causar neurodegeneración a través de la ganancia de una función tóxica de la proteína (Combs y Gamblin, 2012). Sin embargo, algunos autores apoyan la teoría de que la pérdida neuronal podría deberse a una pérdida de función de tau. En este sentido, diferentes evidencias apoyan que la pérdida de la función de tau como proteína estructural de unión a los microtúbulos podría ser la principal causa de la pérdida neuronal (Goedert y Jakes, 2005, Lee, *et al.*, 1989, Trinczek, *et al.*, 1995, Wolfe, 2009). Además de esta función principal, tau tiene otras funciones secundarias, por ejemplo esta proteína está implicada en el desarrollo y el mantenimiento del SNC (Caceres, *et al.*, 1991, Esmaeli-Azad, *et al.*, 1994, Mandelkow y Mandelkow, 2012), en la regulación del crecimiento y la dinámica de los microtúbulos (Panda, *et al.*, 2003), en el transporte axonal (Duncan y Goldstein, 2006) y en la transducción de señales (Ittner, *et al.*, 2010). La pérdida de alguna de estas funciones de tau también podría estar relacionada con la neurodegeneración asociada a la DLFT-TAU.

6.2.2. TDP-43 y FUS, pérdida neuronal asociada a proteínas de unión a ARN

En la mayor parte de las inclusiones neuronales tau negativas de la DLFT, el principal componente es la proteína de unión a ADN/ARN TDP-43, aunque una pequeña parte presentan inmunohistoquímica positiva para FUS, una proteína de características y funciones similares a TDP-43 (Lagier-Tourenne and Cleveland, 2009; Buratti and Baralle, 2010; Chen-Plotkin et al., 2010; Gendron et al., 2010; Lagier-Tourenne et al., 2010; Mackenzie et al., 2010). Entre el 40 y 60% de los pacientes de DLFT presentan inclusiones de TDP-43 en las neuronas y las células de la glía (Diaper, et al., 2013, Nishihira, et al., 2008) por lo que la DLFT-TDP es considerada una de las patologías más frecuentes de la enfermedad (Arai, et al., 2010, Neumann, et al., 2006) mientras que las inclusiones de FUS son una patología mucho menos frecuente en la DLFT, (entre un 5 y un 20% de los pacientes) normalmente asociada a casos esporádicos (Mackenzie, et al., 2011b, Neumann, et al., 2009a).

Ambas proteínas tienen funciones similares, se ha descrito que están implicadas en la regulación del inicio de la transcripción, el *splicing*, el transporte y estabilización del ARN mensajero (Belly, et al., 2005, Boyault, et al., 2007, Mercado, et al., 2005, Orozco y Edbauer, 2013, Schwartz, et al., 2012, Strong, et al., 2007, Wang, et al., 2004, Wang, et al., 2008), la biosíntesis de micro ARN (Buratti, et al., 2010, Kawahara y Mieda-Sato, 2012, Morlando, et al., 2012) y en el mantenimiento de la integridad genómica (Ayala, et al., 2008a, Baechtold, et al., 1999, Dormann y Haass, 2013, Warraich, et al., 2010). Además, TDP-43 interacciona y regula los niveles de ARN no codificantes como por ejemplo MALAT 1 (Polymenidou, et al., 2011) y NEAT1 cuya expresión se ha visto que está aumentada en cerebros con la patología de TDP-43 (Tollervey, et al., 2011). Por otro lado, se ha descrito que en condiciones fisiológicas, una pequeña cantidad de TDP-43 y FUS se encuentra en el citoplasma de las células, por ejemplo asociado a los gránulos de ARN que transportan ARN mensajero hasta las dendritas (Elvira, et al., 2006). Para FUS en particular, hay evidencias de que esos gránulos juegan un papel importante en el transporte intracelular y la regulación de la sinapsis (Belly, et al., 2005, Fujii, et al., 2005).

No se sabe mucho acerca de los mecanismos por los cuales los agregados de estas proteínas contribuyen a la neurodegeneración. Una hipótesis propone que la pérdida de su principal función nuclear como proteínas reguladoras de la expresión génica podría ser la causa principal de la pérdida neuronal (Diaper, *et al.*, 2013, Hoell, *et al.*, 2011, Nishihira, *et al.*, 2008, Nonaka, *et al.*, 2009a, Nonaka, *et al.*, 2009b). Diferentes evidencias apoyan esta hipótesis. Por ejemplo, Igaz y colaboradores (Igaz, *et al.*, 2011), utilizando ratones transgénicos que expresaban la TDP-43 humana, con una señal de localización nuclear defectuosa o la forma silvestre, pudieron demostrar que mientras en ambos ratones había una pérdida neuronal significativa, sólo en el ratón con la TDP-43 silvestre se apreciaban inclusiones citoplasmáticas de TDP-43 fosforilada y ubiquitinizada. En cambio, en el ratón que expresaba la TDP-43 mutante se producían cambios importantes en la expresión génica en neuronas corticales, lo que parece sugerir que la pérdida de la función nuclear de TDP-43 juega un papel predominante en la degeneración selectiva de neuronas vulnerables. Otros autores, sin embargo, proponen que la relocalización de TDP-43 en el citoplasma, genera una ganancia de función tóxica de la proteína que puede jugar un papel crítico en la patogénesis de la enfermedad (Barmada, *et al.*, 2010). En este sentido, se ha sugerido que la presencia de inclusiones de TDP-43 en las células de la glía podría suponer un fallo en el papel protector de estas células sobre las neuronas que podría ser una causa de la pérdida neuronal (Mackenzie, 2007, Neumann, *et al.*, 2007a, Seilhean, *et al.*, 2013). También se ha propuesto que la acumulación aberrante de proteínas mal plegadas en las neuronas puede causar una disfunción celular porque los agregados formados interfieren con procesos celulares esenciales como el transporte intracelular (Forman, *et al.*, 2004).

De forma similar a lo descrito para TDP-43, alteraciones en la distribución núcleo-citoplasmática de FUS y la formación de agregados se han asociado con el aumento de la muerte celular (Chen, *et al.*, 2011, Igaz, *et al.*, 2011, Ju, *et al.*, 2011, Kryndushkin, *et al.*, 2011, Lanson, *et al.*, 2011, Sun, *et al.*, 2011). La toxicidad de los agregados proteicos de

TDP-43 y FUS parece estar relacionada con la capacidad de estas proteínas de unirse al ARN. Así por ejemplo, en *C. elegans*, una mutación en uno de los dos mayores dominios de unión a ARN de TDP-43 fue capaz de bloquear completamente sus efectos neurotóxicos (Ash, *et al.*, 2010). De forma similar, en un modelo de levaduras, mutaciones en el dominio de unión a ARN de FUS fueron capaces de bloquear su toxicidad y agregación (Sun, *et al.*, 2011). Esta capacidad de TDP-43 y FUS de unirse a multitud de ARN mensajeros, las convierte en proteínas multifuncionales, que intervienen en muchas funciones celulares regulando el metabolismo del ARN. Se ha descrito que las neuronas parecen ser especialmente vulnerables a fallos en el procesamiento y transporte de ARN (Liu-Yesucevitz, *et al.*, 2011) lo que explicaría las consecuencias patológicas que pueden derivarse de la pérdida de estas funciones esenciales para la homeostasis celular.

Recientemente se han identificado las dianas de ARN de TDP-43 así como la alteración transcripcional y los patrones de *splicing* asociados a la ausencia de TDP-43 (Polymenidou, *et al.*, 2011, Sephton, *et al.*, 2011, Tollervey, *et al.*, 2011). TDP-43 interacciona con una gran fracción del transcriptoma del ratón (alrededor del 30%), predominantemente a través de interacciones con secuencias ricas en UG en de las regiones intrónicas largas así como las regiones 3'UTR de los ARN mensajeros (Bhardwaj, *et al.*, 2013). TDP-43 también se asocia con un gran número de ARNs no codificantes que muestran alteraciones en su expresión asociadas a la enfermedad (Tollervey, *et al.*, 2011). En una aproximación GWAS (*genome-wide association study*) se identificaron alteraciones en 601 mensajeros y en 965 procesos de *splicing*, que en todos los casos fueron consecuencia directa de la interacción entre ARN y TDP-43. Curiosamente, la mayoría de los genes que muestran una expresión disminuida tras el silenciamiento de TDP-43 contienen intrones más largos que los de genes no afectados. Notablemente este tipo de genes está representado de forma prominente entre los genes regulados a la baja por la ausencia de TDP-43 en el cerebro (Ameur, *et al.*, 2011). Varios de estos genes, *Parkin* (*Park2*), *Neurexin 1 y 3* (*Nrxn1*, *Nrxn3*) y *Neurologin 1* (*Nlgn1*) están implicados en enfermedades neurodegenerativas. De forma independiente, se ha descrito la regulación a la baja del *Neurexin 3* en autopsias cerebrales de pacientes con patología TDP-43 (Tollervey, *et al.*, 2011).

En conjunto, estas observaciones sugieren un papel relevante de TDP-43 y FUS en la neurodegeneración regulando un conjunto de genes en el SNC. Sin embargo, aún queda por saber cuáles son los mecanismos moleculares que subyacen en la regulación del metabolismo del ARN mediada por estas proteínas.

6.3. Estrés oxidativo como causa de neurodegeneración

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) y su eliminación. En condiciones fisiológicas, la producción de ROS es un proceso altamente controlado por antioxidantes como glutatión, α -tocoferol (vitamina E), carotenoides o ácido ascórbico y por enzimas como la catalasa o la glutatión peroxidasa, que convierten el H_2O_2 en H_2O y O_2 . Sin embargo cuando los niveles de ROS sobrepasan la capacidad antioxidante de la célula, el estrés oxidativo puede causar daños celulares irreversibles (Yu y Chung, 2006). Las complejas funciones del cerebro hacen que este órgano consuma gran cantidad de oxígeno, y por lo tanto, genere niveles elevados de ROS, que hacen que las neuronas estén más expuestas a los radicales libres que otros sistemas celulares (Shulman, *et al.*, 2004). Se ha descrito que la patofisiología de las enfermedades neurodegenerativas está asociada a una presencia continua de estrés oxidativo (Andersen, 2004). El mecanismo de respuesta a estrés puede promover supervivencia celular o apoptosis dependiendo del tipo, intensidad o duración del estrés, normalmente a través de la aparición de unos complejos ribonucleoproteicos denominados gránulos de estrés (GE), donde la síntesis de algunas proteínas está temporalmente arrestada (Colombrita, *et al.*, 2009; Liu-Yesucevitz, *et al.*, 2010). Los GE son inclusiones citoplasmáticas transitorias compuestas por proteínas de unión a ARN junto con sus ARN mensajeros diana, con el objetivo de priorizar la síntesis de proteínas con funciones protectoras frente al estrés (Thomas, *et al.*, 2011).

El hecho de que entre los componentes de los GE se encuentren proteínas, como TDP-43 y FUS, presentes en las inclusiones intracelulares características de la DLFT (Bu-

chan y Parker, 2009, Liu-Yesucevitz, *et al.*, 2010), sugiere una relación de los GE con el proceso neurodegenerativo ya sea como precursores de las inclusiones patológicas y/o mediante el secuestro de proteínas esenciales, incluidas las propias proteínas que unen ARN (Bentmann, *et al.*, 2013). Se ha propuesto que en respuesta al estrés se facilita la salida de TDP-43 y FUS desde el núcleo para formar parte de los GE (Bosco, *et al.*, 2010, Colombrita, *et al.*, 2009, Liu-Yesucevitz, *et al.*, 2010). Además, TDP-43 parece jugar un papel relevante en el ensamblaje y mantenimiento de los GE frente al estrés oxidativo, regulando diferencialmente alguno de sus componentes como TIA-1 (*T-cell intracellular antigen 1*) o G3BP-1 (*GTPase-activating protein binding protein 1*) (McDonald, *et al.*, 2011). Estas observaciones resaltan el papel de estas proteínas de unión a ARN en la respuesta celular al estrés, de ahí que las modificaciones post-traduccionales o mutaciones asociadas a la DLFT o en la ELA, pudieran explicar la mayor vulnerabilidad al estrés característica de estas patologías.

Clásicamente, los GE se han considerado neuroprotectores porque están relacionados con el aumento de la síntesis de proteínas protectoras y secuestran factores proapoptóticos. Así, por ejemplo, en una situación de estrés por isquemia, la formación transitoria de gránulos de estrés y la posterior normalización de la traducción, protege a las neuronas de la muerte celular (Jamison, *et al.*, 2008). También se explica por qué mutaciones en genes implicados en la formación de GE como *ATXN2* (*Ataxina 2*) o *SMN* (*survival motor neuron*) se asocian con enfermedades neurodegenerativas (Van Damme, *et al.*, 2011). No obstante, actualmente se asigna un papel neurotóxico a los gránulos de estrés cuando su producción está exacerbada o cuando no pueden disolverse y la represión de la traducción se mantiene en el tiempo.

6.4. Neurodegeneración mediada por fallos en la degradación de proteínas

El sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) y la autofagia son los principales mecanismos celulares para la degradación de proteínas. Ambos juegan un papel importante en la homeostasis celular y la neurodegeneración. El proteasoma es un complejo enzimático por el cual las proteínas previamente marcadas con ubiquitina son procesadas y degradadas, mientras que la autofagia está implicada en la eliminación de orgánulos y proteínas a través de los lisosomas. El proteasoma está formado por un conjunto de proteínas que se pueden agrupar en el complejo 20S o partícula núcleo y 2 complejos 19S o partículas reguladoras (Jung y Grune, 2012). En la partícula núcleo residen las actividades proteolíticas y la subunidad reguladora se encarga de identificar los sustratos y de desplegar las proteínas que van a ser degradadas. La proteólisis que se lleva a cabo en el proteasoma es el principal mecanismo de degradación proteica intracelular y tiene un papel fundamental en la eliminación de proteínas no funcionales, oxidadas o mal plegadas (Davies, 2001, Hovestadt, *et al.*, 2013, Jung y Grune, 2013). El proteasoma está sujeto a una compleja regulación permitiendo a la célula responder a diferentes situaciones de estrés en las que se necesita una degradación proteica activa. El fallo o el mal funcionamiento del proteasoma conlleva la acumulación de proteínas ubiquitinadas y podría ser responsable de la formación de los agregados patológicos de proteínas presentes en muchas enfermedades neurodegenerativas (Gorman, 2008, Lindquist y Kelly, 2011)

Las alteraciones en los sistemas de degradación de proteínas se han asociado con la patogénesis de diferentes enfermedades neurodegenerativas como EA, EP, enfermedad de Huntington y ELA (Catalgol y Grune, 2012, Wong y Cuervo, 2010). En relación con la DLFT, se piensa que las inclusiones proteicas insolubles de TDP-43 se deben, al menos en parte, a fallos en la eliminación de estos agregados por el proteasoma o la autofagia (Kleinberger, *et al.*, 2010, van Eersel, *et al.*, 2011, X. Wang, *et al.*, 2010). Se ha observado que la inhibición de cualquiera de estos dos sistemas de degradación de proteínas lleva a la acumulación citoplasmática de TDP-43 en cultivos celulares (Kleinberger, *et al.*, 2010, van Eersel, *et al.*, 2011, X. Wang, *et al.*, 2010).

Otras evidencias sugieren la implicación de fallos en la degradación de proteínas en la aparición de la DLFT-TDP. En primer lugar, se ha descrito que TDP-43 es capaz de asociarse con proteínas relacionadas con el sistema ubiquitina-proteasoma como Ubiquilin 1 (UBQLN1) y Ubiquilin 2 (UBQLN2) que se han relacionado con la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Kim, *et al.*, 2009) y con la DLFT (Cassel y Reitz, 2013, Vengoechea, *et al.*, 2013b) respectivamente. En segundo lugar, se ha relacionado a la proteína TDP-43 con la histona deacetilasa 6 (HDAC6), una proteína asociada con la degradación de proteínas poliubiquitinizadas por el autofagosoma (Boyault, *et al.*, 2007, J.Y. Lee, *et al.*, 2010). En este sentido, por un lado se ha descrito que la expresión de HDAC6 está regulada por TDP-43 (Fiesel, *et al.*, 2010) y por otro que la formación de agregados de TDP-43 está relacionado con el aumento de los niveles de HDAC6 (Odagiri, *et al.*, 2013). Por último, diferentes trabajos muestran que el tratamiento con estimuladores de la autofagia, como la rapamicina, disminuye la pérdida neuronal, los agregados citosólicos de TDP-43 y la actividad de las caspasas en un modelo de ratón de DLFT-TDP (Wang, *et al.*, 2012, Wang, *et al.*, 2013) por lo que se ha sugerido que el tratamiento con rapamicina o con otros activadores de la autofagia puede ser una estrategia terapéutica en la DLFT-TDP. Sin embargo, hay que tener en cuenta que este tratamiento no puede ser aplicado de forma general, pues en otros casos la inhibición de la autofagia, y no la activación del proceso, se ha relacionado con un incremento de la supervivencia neuronal (Cherra y Chu, 2008, Uchiyama, *et al.*, 2009).

6.5. Neurodegeneración asociada a alteraciones en apoptosis y autofagia

Las tres vías principales implicadas en la muerte neuronal son apoptosis, muerte celular por autofagia y necrosis (Camins, *et al.*, 2008, Cui, *et al.*, 2013). Mientras que la necrosis es un proceso irreversible y sin control alguno, la apoptosis y la autofagia son mecanismos fisiológicos finamente controlados por lo que los fallos en la regulación de alguno de ellos pueden llevar a la neurodegeneración.

6.5.1. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada se postula como el principal mecanismo de muerte neuronal en distintas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Párkinson y DLFT (Mizuno, *et al.*, 1998, Roth, 2001, Tedde, *et al.*, 2012). Morfológicamente, este proceso se caracteriza por la condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y del núcleo de la célula, formación de cuerpos apoptóticos (Kerr, 2002, Lockshin y Zakeri, 2004) y activación de caspasas (Cribbs, *et al.*, 2004) con el mantenimiento de la estructura de las membranas celular y mitocondrial en los estadios iniciales del proceso. El periodo de tiempo entre la iniciación del proceso y la ejecución de apoptosis puede durar horas o días y los cuerpos apoptóticos son fagocitados rápidamente por las células adyacentes o por macrófagos. Por tanto, en una enfermedad neurodegenerativa crónica, solo se detecta un número pequeño de neuronas apoptóticas en un momento dado (Jellinger, 2006, Ziegler y Groscurth, 2004).

Se conocen dos mecanismos principales de apoptosis: la vía extrínseca, que se inicia en un receptor de la membrana celular y la vía intrínseca, relacionada con la mitocondria. En la vía extrínseca, los receptores de la membrana celular que median la apoptosis son miembros de la familia TNFR que tienen un dominio citoplasmático de muerte que se une a una proteína adaptadora capaz de activar las caspasas, iniciando así la apoptosis. La vía intrínseca o mitocondrial, se desencadena tras la salida desde la mitocondria hacia el citosol de factores pro-apotóticos como el citocromo c y el factor de inducción de apoptosis (AIF, del inglés *apoptosis-inducing factor*) dando lugar a la formación del complejo apoptosoma y la activación de las caspasas iniciadoras. Aunque ambas vías se han asociado a patologías neurodegenerativas, la mayoría de los estudios apuntan a una mayor contribución de la apoptosis intrínseca a la neurodegeneración (Eckmann, *et al.*, 2013, Rao, *et al.*, 2013). El daño en el ADN (hereditario o inducido), un aumento en la expresión de algunos genes supresores de tumores, el aumento del influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular y el estrés oxidativo o metabólico son algunas de las causas que pueden alterar la permeabilidad de la membrana mitocondrial y permitir la síntesis o liberación de moléculas

relevantes para el proceso apoptótico (Kermer, et al., 2004). Después de la fase de iniciación de la apoptosis, ambas vías confluyen en la fase de ejecución mediada por caspasas ejecutoras como 3, 6 y 7 que actúan sobre el citoesqueleto, las proteínas de la matriz nuclear y las proteínas implicadas en la transcripción, replicación y reparación del ADN.

Numerosas evidencias sugieren que la pérdida neuronal característica de la DLFT presenta características de apoptosis, por ejemplo se ha observado fragmentación de ADN y activación de caspasa 3 en neuronas y astrocitos de pacientes de DLFT (Su, et al., 2000). Por otro lado también se ha sugerido que una mutación en la proteína pro-apoptótica DAPK1 (*death-associated protein kinase 1*) podría estar relacionada con la aparición de la enfermedad (Tedde, et al., 2012). Debido al papel neuroprotector de la PGRN, en la DLFT, la activación de la apoptosis se ha relacionado frecuentemente con la haploinsuficiencia de PGRN (Xu, et al., 2011b). Se ha descrito que esta proteína es un potente factor anti-apoptótico extracelular en distintos tipos celulares entre los que se encuentran las neuronas (Guerra, et al., 2007, Ryan, et al., 2009, Zanocco-Marani, et al., 1999), por lo que la pérdida de la mitad de los niveles normales de PGRN podría reducir la supervivencia neuronal y sensibilizar a las neuronas a la muerte celular por apoptosis bajo determinadas condiciones, como por ejemplo tras un traumatismo (Gao, et al., 2010, Kleinberger, et al., 2010, Ryan, et al., 2009). Además, se sabe que la PGRN puede promover la supervivencia neuronal y el crecimiento de neuritas a través de la regulación de rutas importantes como PI3K/Akt (fosfatidil inositol kinasa 3) y MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) (De Muynck, et al., 2013, Van Damme, et al., 2008, Xu, et al., 2011b, Zanocco-Marani, et al., 1999). Por otro lado, se ha sugerido que la PGRN puede jugar un papel importante controlando la cinética de la muerte celular programada (Kao, et al., 2011). Esta hipótesis se basa en que, usando mutantes de *C. elegans* deficientes en PGRN, observaron que se producía un aumento notable de la eliminación de células apoptóticas mediante fagocitosis. Es decir, el proceso de apoptosis neuronal no depende exclusivamente de la maquinaria de las neuronas, sino que requiere la participación de otras células como macrófagos y microglía. Estos resultados sugieren que las mutaciones en *GRN* impedirían, por un meca-

nismo de eliminación celular acelerando el proceso fagocítico, la posibilidad de que las células pudieran recuperarse tras cualquier tipo de daño (Kao, *et al.*, 2011). Los cambios en la cinética de la muerte celular inducidos por el déficit de PGRN pueden alterar el equilibrio entre los procesos de supervivencia/muerte celular a lo largo de la vida de los individuos portadores de mutaciones en *GRN*, resultando en pérdida neuronal y la progresión de la enfermedad. Esta función de PGRN, modulando la eliminación de células en apoptosis puede ser relevante para explicar la pérdida neuronal en las enfermedades neurodegenerativas. Aunque este modelo es aún especulativo, diferentes evidencias indican que el déficit de PGRN conlleva un aumento en la actividad de la microglía (Yin, *et al.*, 2010a), por tanto, de forma similar a lo descrito en la EA, en la DLFT asociada mutaciones en *GRN*, la microglía podría actuar facilitando la fagocitosis de células dañadas (Ahmed, *et al.*, 2007, Fuhrmann, *et al.*, 2010).

Las mutaciones en *GRN*, y también en otros genes como *VCP*, están relacionadas con la patología de TDP-43 (Kleinberger, *et al.*, 2010). Diferentes evidencias experimentales relacionan TDP-43 y la pérdida neuronal por apoptosis. Así por ejemplo se ha descrito que la sobreexpresión de TDP-43 induce muerte neuronal a través de cambios en los niveles de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas como Bim (*Bcl2-interacting mediator of cell death*), CHOP (*C/EBP homologous protein*) y Bcl-x (*B-cell lymphoma-extra large*) (Suzuki y Matsuoka, 2013), o que la expresión de la TDP-43 humana en levaduras, induce un aumento en los niveles de marcadores de estrés oxidativo y apoptosis (Braun y Zischka, 2008). La muerte celular inducida por TDP-43 se ha relacionado con fallos en el propio procesamiento de la proteína, con alteraciones en el tránsito núcleo-citoplasma, con la formación de inclusiones citoplasmáticas y con la presencia de TDP-43 en los gránulos de estrés (Higashi, *et al.*, 2013). Se ha descrito que el corte patológico de TDP-43 en fragmentos C-terminales es llevado a cabo por las caspasas (Kokoulina y Rohn, 2010, Rohn, 2009), lo que sugiere que el aumento de actividad de las caspasas necesario para el corte patológico de TDP-43 podría desencadenar la apoptosis en las células dañadas (McIlwain, *et al.*, 2013, Takahashi, 1999). No obstante, otros autores no han encontrado evidencias de activación significativa de caspasas y apoptosis en un modelo de pez cebra con la proteino-

patía de TDP-43 (Shankaran, *et al.*, 2008) ni en ratones nulos *Grn*^{-/-} (Ahmed, *et al.*, 2010). Además se ha descrito que la formación de agregados de TDP-43 puede ser tóxica para la célula, y alternativamente, puede producir el secuestro de la proteína, impidiendo el normal funcionamiento de la misma (Xu, 2012).

Por último, como ya se ha descrito en un apartado anterior, la TDP-43 está relacionada con la respuesta al estrés a través de su localización en los GE (Liu-Yesucevitz, *et al.*, 2010). Se ha descrito que los GE secuestran proteínas reguladoras de apoptosis, probablemente para prevenir su interacción con otros factores que pudieran inducir la muerte celular, salvo en condiciones de estrés severo en las que las células serían incapaces de recuperarse (Buchan y Parker, 2009). De esta forma, los GE juegan un papel importante en la decisión celular de entrar en apoptosis dependiendo de la naturaleza y dimensión del estrés. En condiciones de estrés crónico, como en la DLFT-TDP, la presencia de agregados de TDP-43 fosforilada y ubiquitinizada, podría causar la sobreactivación de los GE y una respuesta apoptótica exacerbada.

6.5.2. Autofagia

La autofagia es un proceso crítico para el mantenimiento la homeostasis celular que tiene como objetivo principal la degradación en los lisosomas de proteínas citosólicas alteradas y orgánulos envejecidos (Mizushima y Komatsu, 2011). A través de la autofagia, la célula dispone de precursores y energía para la síntesis de moléculas necesarias, a la vez que elimina estructuras perjudiciales para sí misma. A pesar de esta función, eminentemente protectora, se ha descrito que la sobreactivación de la autofagia podría ser suficiente para causar la muerte celular (Gozuacik y Kimchi, 2004, Lamy, *et al.*, 2013). Morfológicamente, este proceso se caracteriza por la ausencia de condensación de la cromatina y la presencia de vacuolas en el citoplasma (Amelio, *et al.*, 2011).

En los últimos años se han acumulado gran cantidad de evidencias que sugieren que la desregulación de la autofagia juega un papel relevante en la etiología y progresión

de las enfermedades neurodegenerativas (Wong y Cuervo, 2010). Se sabe que las neuronas expresan altos niveles de las moléculas relacionadas con la maquinaria autofágica de un modo dependiente del subtipo neuronal (Grishchuk, *et al.*, 2011). Por otro lado, diferentes trabajos han demostrado que la supresión de la autofagia es capaz de causar neurodegeneración en varios modelos de ratón (Hara, *et al.*, 2006, Komatsu, *et al.*, 2006, Liang, *et al.*, 2010). A pesar de que se han encontrado vacuolas autofágicas en las neuronas de diferentes enfermedades neurodegenerativas (Mizushima, *et al.*, 2008), existe controversia en torno a si la muerte neuronal se produce por autofagia. Por el contrario, sí hay consenso en aceptar que la implicación de la autofagia en los procesos neurodegenerativos está asociada a la regulación del procesamiento y acumulación de proteínas. La naturaleza postmitótica de las neuronas, hace que estas células sean especialmente sensibles a la presencia de agregados o componentes citosólicos dañados. Al no poder disminuir o redistribuir estos componentes tóxicos en células hijas mediante la división celular, las neuronas dependen del correcto funcionamiento de la autofagia para su supervivencia (Tooze y Schiavo, 2008). También hay que tener en cuenta que debido a la especial morfología de las neuronas, es necesario un flujo regulado de componentes de la autofagia hacia y desde las proyecciones citoplasmáticas. De esta forma, la autofagia está implicada también en la remodelación constante de las terminales neuronales que participan en la plasticidad (Komatsu, *et al.*, 2007). En base a estos antecedentes, no es sorprendente que exista un vínculo entre las alteraciones en la autofagia y el desarrollo de ciertas enfermedades neurodegenerativas.

Existen tres formas de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (CMA por sus siglas en inglés, *chaperone mediated autophagy*). La macroautofagia es una forma de degradación en la que se forma un autofagosoma de doble membrana que se fusionará con el lisosoma que contiene el ambiente ácido y las enzimas necesarias para la degradación. La microautofagia requiere la captación y degradación directa por los lisosomas de componentes del citoplasma, sin que se necesiten vesículas de transporte. La tercera forma de autofagia, la CMA, es muy específica para un número con-

creto de proteínas solubles del citosol, que serán reconocidas por HSP70 (heat shock protein 70) y dirigidas al lisosoma para su degradación. En general, se han descrito alteraciones en la macroautofagia y la CMA relacionadas con el envejecimiento y la neurodegeneración (Cuervo, 2004). La mayoría de estas alteraciones están asociadas con la incompleta eliminación de inclusiones en el citoplasma, lo que a su vez podría seguir favoreciendo la agregación y la pérdida neuronal. Así por ejemplo, en un ratón modificado genéticamente para anular la autofagia, se observó un aumento en el número y tamaño de las inclusiones con la edad, además de pérdida neuronal y muerte a las 28 semanas (Komatsu, *et al.*, 2006).

Como ya hemos mencionado, en el sistema nervioso, la autofagia tiene una función esencialmente neuroprotectora y se duda de que la hiperactivación de la autofagia pueda ser causa directa de muerte neuronal. Sin embargo el mal funcionamiento de la autofagia puede indirectamente causar apoptosis y necrosis. Cuando la eliminación de autofagosomas está comprometida, los componentes presentes en los mismos producen cambios en la permeabilidad de los lisosomas permitiendo la salida de hidrolasas (Boya y Kroemer, 2009) y la acumulación de intermediarios autofágicos tóxicos (J.H. Lee, *et al.*, 2010). Por otra parte, la autofagia no solamente regula la degradación de las inclusiones patológicas en las proteinopatías (Yamamoto y Simonsen, 2011) sino también el recambio mitocondrial (Santos, *et al.*, 2011), por tanto, la presencia de mitocondrias dañadas podría contribuir a la citotoxicidad y eventualmente a la muerte celular debido a la liberación de radicales libres.

Hasta la fecha, no se ha estudiado con detalle la relación entre la autofagia y la fisiopatología de la DLFT, sin embargo diferentes evidencias relacionan los fallos en la autofagia con la aparición de la DLFT-TDP. Por un lado, se ha descrito que tanto la proteína TDP-43 completa como las formas fragmentadas son sustratos del sistema autofágico (X. Wang, *et al.*, 2010). Por otro, diferentes evidencias indican que TDP-43 está implicada en la regulación de la expresión de uno de los componentes más importantes de la autofagia,

Atg7 (Bose, *et al.*, 2011). Es importante destacar también que algunas mutaciones asociadas a la DLFT afectan a genes relacionados con la autofagia. Por ejemplo se ha descrito que las mutaciones en el gen *CHMP2B* que codifica para un componente de ESCRT-III (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport-III*) causa acumulación de agregados de proteínas ubiquitinadas y autofagosomas debido a una disfunción en la fusión de los autofagosomas con los lisosomas, que eventualmente lleva a neurodegeneración. Por otro lado, se ha descrito que los individuos diagnosticados de DLFT asociada a mutaciones en el gen *VCP* que codifica para una ATP-asa implicada en el proceso de fusión de vesículas y la degradación de proteínas durante el estrés del retículo, presentan también fallos en la autofagia (Ju, *et al.*, 2009, Ju y Wehl, 2010, Waugh, *et al.*, 2003).

6.6. Alteraciones en el ciclo celular como causa de neurodegeneración

Hace unos años, los conceptos división y muerte celular parecían dos procesos separados y totalmente opuestos, sin embargo, diferentes trabajos publicados en los últimos 15 años muestran evidencias de que las alteraciones en la maquinaria del ciclo celular pueden jugar un papel relevante en el comienzo y progresión de la neurodegeneración (Arendt, *et al.*, 1996, Copani, *et al.*, 2001, Katsel, *et al.*, 2013, Nagy, *et al.*, 1997). Actualmente se cree que la reactivación del ciclo celular en neuronas maduras es un evento letal, por ello el control del ciclo de división celular es considerado un factor crítico en la prevención de la neurodegeneración (Copani, *et al.*, 2001, Herrup, *et al.*, 2004, Klein y Ackerman, 2003, Liu y Greene, 2001, Yang, *et al.*, 2003).

El ciclo celular es un conjunto ordenado de eventos que llevan al crecimiento de la célula y la división en dos células hijas. Como muestra la figura 11, este proceso se divide en cuatro fases (G_1 , S, G_2 y M) y está regulado por complejos ciclina/kinasa dependiente de ciclina (CDK).

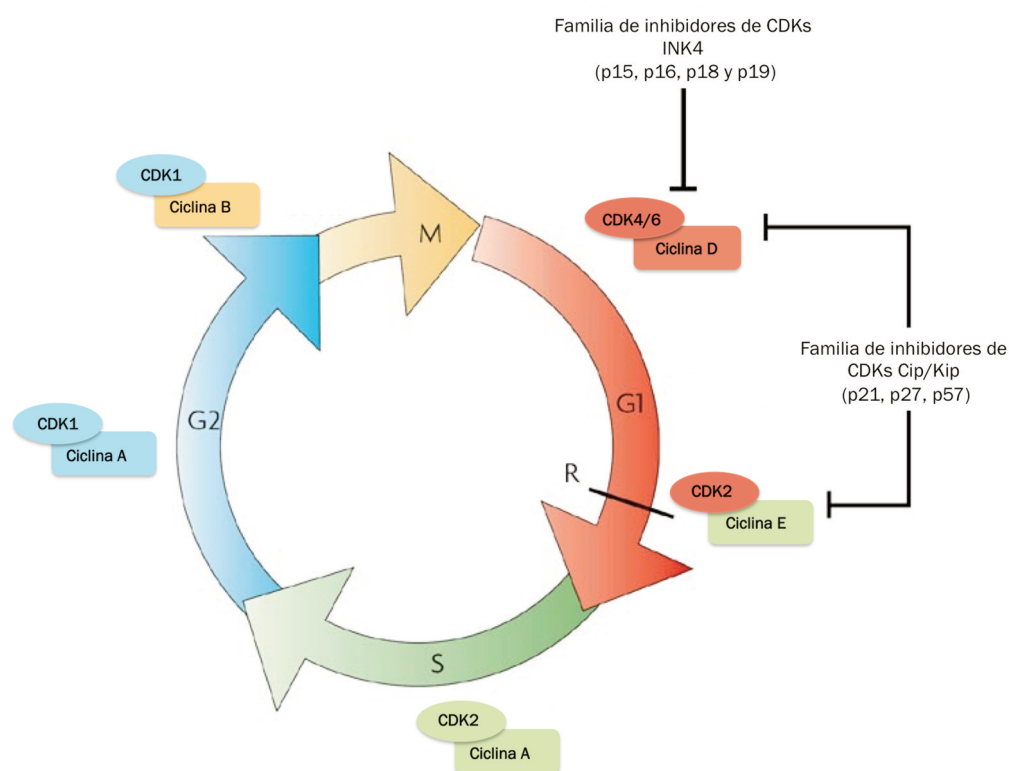


Fig.11. Esquema representativo de la progresión y regulación del ciclo celular en eucariotas

La fase G₁, del inglés *GAP 1* (Intervalo 1) es la fase de crecimiento y preparación. Durante esta fase, diferentes señales mitogénicas desencadenan la activación de la ciclina D, que tras su unión a CDK4 o CDK6 hace que estas quinasas sean capaces de fosforilar a la proteína del retinoblastoma (pRb) impidiendo su unión al factor de transcripción E2F-1 que, cuando se encuentra libre, es capaz de activar la transcripción de genes necesarios para la progresión del ciclo celular. Al final de esta fase es necesario un incremento de la actividad del complejo ciclina E/CDK2 para asegurar la progresión hacia la siguiente fase. Una vez superado este punto, la entrada en ciclo es irreversible. Le sigue la fase S que representa la “síntesis”, en la que el complejo ciclina A/CDK2 fosforila sustratos que permiten la replicación del ADN. Después, en la fase G₂, del inglés *GAP 2* (Intervalo 2) la célula se

prepara para la división mediante el control del complejo ciclina A/CDK1. Finalmente, el complejo ciclina B/CDK1 se encarga de permitir la progresión a la fase M, de mitosis, en la cual los cromosomas se condensan y se dirigen a los polos opuestos de la célula antes de que se escinda el citoplasma para obtener dos células hijas. Al igual que los complejos entre ciclinas y CDKs están regulando la progresión del ciclo mediante la fosforilación de diferentes sustratos, existen una serie de inhibidores del ciclo celular que actúan conjuntamente a los complejos ciclina/CDK, evaluando posibles daños y deteniendo el proceso en puntos de control establecidos. Estos inhibidores se organizan en dos familias, INK4 (*Inhibitors of Cyclin D-dependent kinase 4*) y Cip/kip (*CDK Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein*), la primera está formada por p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d} y la segunda por p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2} (Csikasz-Nagy, et al., 2011, Grana y Reddy, 1995, Murray, 2004).

La relación causa-efecto entre proliferación y muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas podría encontrarse en el hecho de que las neuronas diferenciadas, al conservarse en un estado postmitótico permanente, carecen de la maquinaria necesaria para completar con éxito el ciclo de división celular (Herrup, et al., 2004). De esta forma, cualquier señal persistente que indujera a las células a entrar en ciclo, conduciría inevitablemente a su muerte. Diferentes trabajos aportan evidencias de la muerte neuronal asociada a la reentrada en el ciclo celular por parte de neuronas postmitóticas. Una de las primeras publicaciones en este sentido mostraba un aumento en la muerte de las células de Purkinge en unos ratones transgénicos que expresaban el oncogén antígeno T del virus SV40 de forma específica en esas células. El oncogen había provocado la entrada con éxito en ciclo celular de estas neuronas pero por alguna causa desconocida no podían completar su división (Feddersen, et al., 1992). Más tarde, un experimento realizado con ratones que expresaban de manera inducible el mismo oncogen de SV40, confirmó la degeneración neuronal tras la activación del ciclo celular descartando que estas observaciones se debieran a fallos en el desarrollo del SNC (Park, et al., 2007). Otros trabajos realizados en cultivos celulares, han confirmado las consecuencias deletéreas que tiene la activación del

ciclo en neuronas diferenciadas. Por ejemplo, se demostró la activación de CDKs tras el tratamiento de cultivos celulares con camptotecina, una droga que induce daños en el ADN (Stefanis, *et al.*, 1999) o que la apoptosis inducida por retirada de potasio en células granulares del cerebelo estaba mediada por un incremento en la expresión de proteínas relacionadas con el ciclo celular (Padmanabhan, *et al.*, 1999). Otros autores propusieron una relación entre la activación del ciclo celular, apoptosis y daño en el ADN de neuronas producido por compuestos genotóxicos, descartando la activación del ciclo sólo por estímulos apoptóticos (colchicina, estaurosporina, etc.) (Kruman, *et al.*, 2004). También es evidente la relación entre muerte y activación aberrante de ciclo celular en otros modelos animales como en los ratones con la mutación *staggerer* en los que algunas poblaciones neuronales presentaban niveles elevados de CDK4, PCNA e incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU) (Herrup y Busser, 1995), en ratones con la mutación *harlequin* (Klein, *et al.*, 2002) y en un modelo de ratón que expresa c-Myc de forma inducible que, además de mostrar que la entrada en ciclo celular produce muerte neuronal, presentaba gliosis y déficits cognitivos (Lee, *et al.*, 2009).

Existen evidencias claras de alteraciones en el control del ciclo celular asociadas a la pérdida neuronal en diferentes enfermedades neurodegenerativas entre las que se encuentran la EA, EP y ELA (Ayala, *et al.*, 2008a, Cheung y Ip, 2012, Husseman, *et al.*, 2000, McShea, *et al.*, 1997, Smith y Lippa, 1995).

En la DLFT, diferentes evidencias apoyan la relación entre el ciclo celular y la pérdida neuronal en la DLFT-TAU (Seward, *et al.*, 2013). Así por ejemplo, se ha descrito un marcaje positivo de pRb y otros marcadores mitóticos en cortes histopatológicos de taupatías relacionadas con la DLFT como la PSP y la DFTP-17 (Husseman, *et al.*, 2000, Stone, *et al.*, 2011). Además, la fosforilación de tau en Thr231 se ha vinculado con la activación de la ruta de señalización p44/42 MAPK y con la posible activación del ciclo celular (Leugers, *et al.*, 2013).

Por otro lado, las propiedades mitogénicas y neurotróficas de la PGRN sugieren que su déficit pudiera inducir alteraciones en el control del ciclo celular en las neuronas afectadas de pacientes de DLFT-TDP (Van Damme, *et al.*, 2008). La PGRN es capaz de activar las principales cascadas de señalización relacionadas con la proliferación celular como p44/42 MAPK y PI3K, tanto en células no neuronales (Ong y Bateman, 2003) como en el SNC (Nedachi, *et al.*, 2011, Piscopo, *et al.*, 2010, Xu, *et al.*, 2011a). En este sentido, es interesante mencionar que, en el análisis de la expresión diferencial de genes en el cerebro de pacientes de DLFT con mutaciones en *GRN*, destacan fundamentalmente genes relacionados con la señalización vía TGF α (del inglés, Transforming growth factor α) y genes reguladores del ciclo celular (Chen-Plotkin, *et al.*, 2008). Como se sugiere en el trabajo de Ayala (2008), el vínculo entre el déficit de PGRN y la desregulación del ciclo celular podría depender de TDP-43. En este trabajo se describe que la pérdida de función nuclear de TDP-43 inhibiendo la transcripción de CDK6 produce un aumento de la actividad de los complejos ciclina/CDK y de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb), proteínas clave en el control del tránsito entre las fases G₁ y S del ciclo celular (Ayala, *et al.*, 2008a). Por otro lado, se ha descrito que la proteína CDC7 (cell division kinase 7) participa en la fosforilación de TDP-43 en *C. elegans* y que su inhibición no solo previene la fosforilación de la proteína, sino que también frena el proceso neurodegenerativo (Liachko, *et al.*, 2013, Moujalled, *et al.*, 2013). En pacientes con DLFT-TDP también se ha observado un aumento de la expresión neuronal de CDC7. Por otra parte, algunas CDKs también contribuyen a la fosforilación de TDP-43, de manera que inhibidores específicos de CDKs son capaces de bloquear la acumulación de TDP-43 en diversos modelos celulares. En conjunto estas observaciones apoyan la idea de que alteraciones en el control del ciclo celular pueden jugar un papel relevante en el proceso neurodegenerativo de la DLFT-TDP a través de inducir cambios en el metabolismo de TDP-43.

7

Perspectivas terapéuticas

La heterogeneidad clínica, genética y patológica de la DLFT ha dificultado la búsqueda de tratamientos para la enfermedad, por lo que hasta el momento no hay terapias aprobadas por la *US Food and Drug Administration* (FDA) o por la Agencia Europea del Medicamento para el tratamiento específico de la DLFT.

Actualmente, el tratamiento de la DLFT se basa en el uso de drogas de las que se conoce su eficacia en el tratamiento de otras enfermedades neurodegenerativas (Bei, et al., 2010) además de en estrategias no farmacológicas dirigidas a la educación de la familia y los cuidadores que pueden ayudar a facilitar la vida al paciente. Acciones de gran ayuda son la terapia física, ocupacional o del lenguaje y un programa de ejercicios estructurado que puede ayudar a paliar los síntomas motores.

Hay varios ensayos clínicos en marcha para el tratamiento de la DLFT (Boxer y Boeve, 2007, Vossel y Miller, 2008) (www.clinicaltrial.gov ; www.clinicaltrialsregister.eu). Estos ensayos clínicos pueden dirigirse a la búsqueda de compuestos indicados para el tratamiento de los síntomas, o pretenden encontrar fármacos capaces de actuar sobre los mecanismos moleculares de la patogénesis. En este caso, la identificación de biomarcadores asociados al proceso neurodegenerativo es imprescindible para probar la eficacia de drogas que puedan modificar la aparición y/o la progresión de la enfermedad (Bigni, et al., 2012).

7.1. Tratamientos sintomáticos

La heterogeneidad clínica y sintomática de los pacientes de DLFT deriva de las complejas funciones de las partes del SNC asociadas con la enfermedad como son los lóbulos frontal y temporal, el cerebelo, la médula espinal y el cuerpo estirado (Pan y Chen, 2013). Además, cada presentación clínica puede aparecer de forma esporádica o asociada a mutaciones que a su vez pueden dar lugar patologías diferentes de la enfermedad (Sieben, et al., 2012).

Existen evidencias de que los pacientes diagnosticados de DFT presentan desregulación en los sistemas de neurotransmisores como el colinérgico, dopaminérgico, GABAérgico, glutamatérgico, noradrenérgico y serotoninérgico (Bowen, *et al.*, 2008, Ferrer, 1999, Odawara, *et al.*, 2003, Procter, *et al.*, 1999, Rinne, *et al.*, 2002, Sjogren, *et al.*, 1998). La modulación de estos sistemas de neurotransmisores puede ser una buena opción terapéutica para el tratamiento de la enfermedad (Huey, *et al.*, 2006). Hasta la fecha se han realizado algunos ensayos clínicos en los que se han usado inhibidores del sistema glutamatérgico como memantina (Boxer, *et al.*, 2009), inhibidores de colinesterasa (Mendez, *et al.*, 2007), inhibidores de recaptación de serotonina y otros antidepresivos (Swartz, *et al.*, 1997), antipsicóticos (Czarnecki, *et al.*, 2008), psicoestimulantes (Rahman, *et al.*, 2006), mediadores de la inflamación (Tobinick, 2008) y antiepilépticos (Cruz, *et al.*, 2008).

En general, la medicación efectiva para el tratamiento de otras enfermedades es comúnmente usada como terapia para la DLFT. Sin embargo, ningún tratamiento ha mostrado ser lo suficientemente efectivo como para ser recomendado para el uso en todos los pacientes de DLFT. Debido a la gran variabilidad de síntomas asociados a la DLFT se usan drogas dirigidas al tratamiento de los síntomas de comportamiento, cognitivos y motores (Tabla 4).

7.1.1. Tratamientos dirigidos a los síntomas comportamentales y psiquiátricos

Los síntomas comportamentales más comunes de la DLFT son las tendencias obsesivo-compulsivas, los comportamientos sociales inadecuados, la pérdida del contacto interpersonal y los cambios de personalidad. Muchos de estos síntomas están asociados a la desregulación de las vías serotoninérgicas, dopaminérgicas y no-adrenérgicas y por ello los tratamientos más usados son antipsicóticos y antidepresivos como trazodona, paroxetina, sertralina, selegilina y moclobemida (Chow, 2005, Freedman, 2007, Kaye, *et al.*, 2010, Mendez, 2009) que han mostrado efectos beneficiosos en el tratamiento de las tendencias obsesivo-compulsivas y la agitación motora.

De todas las terapias basadas en la regulación de los neurotransmisores usadas para el tratamiento de la DLFT, las drogas que modifican las vías serotoninérgicas han sido las más usadas (Huey, *et al.*, 2006,Yang y Schmitt, 2001). Muchos de los síntomas conductuales de la DLFT como la depresión, comportamiento compulsivo, desinhibición, movimiento estereotipado y desregulación alimenticia responden bien a inhibidores selectivos de recaptación de serotonina (SSRIs) o a inhibidores de la recaptación de norepinefrina-serotonina como fluoxetina, fluvoxamina, sertralina, tradozona, paroxetina y bupropion que se usan comúnmente para el tratamiento de la DFTP-17 (Ikeda, *et al.*, 2004b,Moretti, *et al.*, 2003,Swartz, *et al.*, 1997).

Tabla 4: Terapias farmacológicas para tratar los síntomas de la DLFT.

Síntoma	Tratamiento	Moléculas Candidatas
Trastornos comportamentales y psiquiátricos	Inhibidores selectivos de recaptación de la serotonina (SSRIs)	Fluoxetina Fluvoxamina Sertralina Tradozona Paroxetina
	Agentes dopaminérgicos	Selegilina
	Inhibidores MAO-A	Moclobemida
	Antipsicóticos atípicos	Aripiprazol Risperidona Alonzapina Quetiapina
	Psicoestimulantes	Metilfenidato
	Antagonistas del receptor de glutamato (NMDA)	Memantina
	Otros	Hormona Oxitocina
Síntomas congénitos	Agentes dopaminérgicos	Bromocriptina
	Inhibidores de colinesterasa	Donepezilo Venlafaxina Rivastigmina
Trastornos motores asociados con el parkinsonismo	Agentes dopaminérgicos	Levodopa Carbidopa Pramipexol
Trastornos motores asociados con DFT-EMN	Bloqueo de canales de sodio	Riluzol

Los síntomas psicóticos más severos como agitación y alucinaciones se tratan con antipsicóticos atípicos. Estos compuestos han de ser usados con precaución ya que se ha visto que su uso incrementa el riesgo de infarto (Jeste, *et al.*, 2008, Wang, *et al.*, 2006). Algunos de los más usados son aripiprazol que aumenta el metabolismo de la glucosa en el lóbulo frontal por lo que puede ayudar a restaurar la disfunción frontal (Fellgiebel, *et al.*, 2007) y el psicoestimulante metilfenidato (Rahman, *et al.*, 2006). El tratamiento con algunos de estos antipsicóticos como risperidona, olanzapina y quetiapina muestran aumento de riesgo de parkinsonismo (Czarnecki, *et al.*, 2008).

La memantina, un antagonista no competitivo de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) que se usa en el tratamiento de la EA (Reisberg, *et al.*, 2003), ha mostrado beneficios evidentes en la mejora de los síntomas comportamentales de la DLFT aunque también se usa para el tratamiento de los cognitivos (Boxer, *et al.*, 2009, Swanberg, 2007).

Recientemente se ha descrito que la hormona oxitocina, que es conocida por tener efectos en las interacciones sociales humanas, mejora las relaciones sociales de los pacientes de DLFT después de una semana de uso (Jesso, *et al.*, 2011). Aunque posiblemente los efectos de esta hormona sean transitorios y no tenga efectos a largo plazo, se cree que puede ser un agente efectivo para tratar los síntomas de la DFT asociados al comportamiento.

7.1.2. Tratamientos dirigidos a los síntomas cognitivos

Los síntomas cognitivos en la DLFT incluyen pérdida de las funciones ejecutivas, falta de atención y alteraciones del lenguaje, tanto en su fluencia como fallos semánticos (Arvanitakis, 2010). Se ha documentado una disfunción colinérgica (Odawara, *et al.*, 2003) y en menor grado glutamatérgica (Ferrer, 1999) asociada a los síntomas cognitivos de la DLFT. Aunque el sistema colinérgico aparece relativamente intacto en comparación con otras enfermedades como EA, hay evidencias de que el tratamiento con inhibidores de ace-

tilcolinesterasa como galantamina o donezepilo pueden ser beneficiosos para el tratamiento de los pacientes de APPNF con alteraciones en el lenguaje y también DFT-vc (Kertesz, *et al.*, 2008, Mendez, *et al.*, 2007). Por otro lado, un estudio con bromocriptina, un agonista dopaminérgico que se usa en el tratamiento del párkinson, demostró un aumento significativo de la mejora en el lenguaje de pacientes de DLFT, aunque los efectos de este tratamiento parecen limitados (Reed, *et al.*, 2004).

7.1.3. Tratamientos contra los trastornos motores

La rigidez, atrofia muscular, contracciones involuntarias, dificultades al tragar y movimientos extraoculares anormales pueden ser signos de DFT asociada al cerebelo o enfermedad de la motoneurona (EMN) (Pasquier, *et al.*, 2012, Seelaar, *et al.*, 2011). El tratamiento de los síntomas relacionados con parkinsonismo sigue las guías generales del tratamiento de la enfermedad de Parkinson usando carbidopa-levodopa y agonistas dopaminérgicos como pramipexol o ropinorol que actúan en la terminal postsináptica. Se ha visto que la respuesta a levodopa es menos efectiva particularmente en el SCB y PSP (van Balken y Litvan, 2006). Hay evidencias de que el tratamiento con riluzol es beneficioso en la ELA-EMN (Bellingham, 2011, Bensimon, *et al.*, 1994) por lo que los pacientes de DFT-EMN pueden ser tratados con riluzol, que bloquea parcialmente los canales de sodio además de bloquear los receptores glutamato.

Los síntomas pseudobulbares (paso de la risa al llanto) propios de la DFT-EMN y PSP, presumiblemente mediados a través de patología del cerebelo, son tratados de forma efectiva con antidepresivos e inhibidores de recaptación de la serotonina (Rosen y Cummings, 2007).

La incontinencia urinaria es un problema común asociado a DFT-EMN ya que los pacientes carecen de la capacidad de controlar sus esfínteres. Estos trastornos suelen ser tratados con anticolinérgicos.

7.2. Búsqueda de Tratamientos dirigidos contra dianas moleculares de la DLFT

Los avances en el conocimiento de las bases genéticas e histopatológicas de la DLFT han permitido desarrollar terapias específicas basadas en modificar los mecanismos moleculares relacionados con la enfermedad. El desarrollo de estas terapias depende no solo de entender los mecanismos y el curso de la enfermedad, sino también de generar herramientas específicas como modelos animales o bibliotecas de compuestos que sean de fácil acceso para todos los investigadores. Es crítico identificar compuestos que tengan una buena penetración a través de la barrera hematoencefálica con unas vidas medias más o menos altas y que sean razonablemente seguros para usarlos en una terapia duradera.

7.2.1. Terapias dirigidas al tratamiento de la DLFT-TAU

Los depósitos de proteína tau son una marca patológica de distintas enfermedades neurodegenerativas entre las que se encuentran la EA y la DLFT (Hutton, *et al.*, 1998, Poor-kaj, *et al.*, 2002), aunque desde una perspectiva genética, las mutaciones en el gen *MAPT* son responsables de la DLFT pero no de la EA (Combs y Gamblin, 2012). Como ya se ha descrito, la DLFT-TAU se caracteriza por la presencia de alteraciones en el *splicing* del ARNm de *MAPT* además del corte y la fosforilación de tau que finalmente llevan a la alteración de la su función normal y contribuyen a la deposición de la proteína en las neuronas o células de la glía (Wang y Liu, 2008). Como se muestra en la tabla 5, se ha propuesto el uso de compuestos capaces de revertir estas modificaciones patológicas como posible tratamiento de la DLFT-TAU (Bigni, *et al.*, 2012, Brunden, *et al.*, 2009, Crowe, *et al.*, 2007, Mazanetz y Fischer, 2007, Trojanowski, *et al.*, 2008, Vossel y Miller, 2008).

La mayor parte de las estrategias terapéuticas van dirigidas a impedir la formación de los agregados patológicos de tau o favorecer su eliminación. Se ha descrito que la proteína tau hiperfosforilada es más propensa a agregarse y se conocen algunas kinasas en-

cargadas de fosforilar a tau como GSK-3 (glicogeno sintasa kinasa 3), CDK5 (kinasa dependiente del ciclo celular 5), ERK2 y MARK (kinasa reguladora de la afinidad por los microtubulos). Diferentes evidencias muestran que inhibidores selectivos de GSK-3 como el litio y el ácido valproico son efectivos en el tratamiento de otras enfermedades neurodegenerativas, por lo que éstos y otros inhibidores pueden ser un nuevo tratamiento para la DLFT-TAU (De Sarno, *et al.*, 2002, Richet, *et al.*, 2012). Por otro lado, la manipulación farmacológica de la glicosilación y acetilación de tau puede impedir la formación de agregados de la proteína a través de la inhibición de la fosforilación (Fischer, 2008, Min, *et al.*, 2010). Además, se ha descrito el efecto terapéutico beneficioso del uso de pequeñas moléculas que actúan como inhibidores de la agregación de tau (Bulic, *et al.*, 2009) como el azul de metileno (Wischik, *et al.*, 1996), las antraquinonas, N-fenilaminas, feniltiazolhidridos y rodaninas (Bulic, *et al.*, 2013), éstos compuestos, además de inhibir la agregación de tau, también pueden eliminar los filamentos ya existentes.

Para inducir la degradación de las inclusiones de tau se ha propuesto el uso de drogas capaces de incrementar la actividad de los sistemas de degradación de proteínas de la célula como el sistema ubiquitina-proteasoma (Ravikumar y Rubinsztein, 2004) y la autofagia (Chesser, *et al.*, 2013). En este sentido se ha propuesto que algunos compuestos inductores de la autofagia celular como la rapamicina (Berger, *et al.*, 2006, Ozelik, *et al.*, 2013) o agentes lisosomotróficos como NH_4Cl o cloroquina (Hamano, *et al.*, 2008) pueden ser usados en el tratamiento de la DLFT. Existe una relación entre la inducción de la autofagia y la muerte celular, por lo que la búsqueda de dianas moleculares cuya inhibición pueda específicamente activar la autofagia sin comprometer la viabilidad celular es esencial para tratamiento para la DLFT (Lipinski, *et al.*, 2010). El sistema de chaperonas está relacionado con el sistema ubiquitina-proteasoma, por lo que la alteración algunas de sus proteínas como HSP90 o HSP70 puede ser una estrategia alternativa para eliminar los agregados de tau asociados a la DLFT (Dickey, *et al.*, 2007, Luo, *et al.*, 2007).

Además de las terapias dirigidas a eliminar las inclusiones de tau, también se han propuesto otros tratamientos para la DLFT-TAU. Por ejemplo, se ha propuesto el uso de drogas capaces de reducir los niveles de tau ya sea inhibiendo su expresión con drogas como la rotenona (Dickey, *et al.*, 2006) o mediante la inmunosupresión de la proteína (Yoshiyama, *et al.*, 2007). Por otro lado se piensa que el uso de estabilizadores del *splicing* como la neomicina (Varani, *et al.*, 2000) y mitoxantrona (Liu, *et al.*, 2009) puede ser beneficioso para el tratamiento de la enfermedad. Además, también se están usando otras drogas capaces de estabilizar el mensajero ya sea uniéndose directamente a él (Donahue, *et al.*, 2007) o mediante un método capaz de reprogramar el ARNm llamado SMarT (del inglés *Spliceosome-mediated RNA trans-splicing*) cuya eficacia ha sido testada en células transfectadas con tau (Puttaraju, *et al.*, 1999, Rodríguez-Martin, *et al.*, 2005). También se ha propuesto que el uso de compuestos estabilizadores de los microtúbulos como paclitaxel (Brunden, *et al.*, 2011, Zhang, *et al.*, 2005) y davunetide (Jouroukhin, *et al.*, 2013) pueden ser efectivos en el tratamiento de la DLFT-TAU ya que se ha descrito que las mutaciones en *MAPT* hacen que tau pierda su capacidad de unirse a los microtúbulos.

Tabla 5: Compuestos con potencial terapéutico para el tratamiento de la DLFT-TAU

Diana	Mecanismo propuesto	Moléculas candidatas
TAU	Moduladores del splicing de MAPT	Neomicina Mitoxantrona
	Drogas estabilizadoras de microtubulos	Paclitaxel Davunetide
	Inhibidores de la hiperfosforilación de Tau	Litio Acido Valproico NP12 (tideglusib)
	Inhibidores de la agregación de Tau	Azul de Metileno Antraquinonas N-fenilaminas Feniltiazolhidrazidos Rodaninas
	Degradación de Tau por el sistema ubiquitina-proteasoma	HSP90 y HSP70 Co-chaperonas
	Degradación de Tau por la autofagia celular	Rapamicina NH4Cl o cloroquina
	Aumento de la función mitocondrial Inmunosupresión de Tau	Coenzima Q10 (CoQ10) Anticuerpos anti-tau Vacunas
	Moduladores de la expresión de tau	Rotenona

7.2.2. Terapias dirigidas al tratamiento de la DLFT asociada a mutaciones en GRN

Debido a las consecuencias patogénicas de la haploinsuficiencia de PGRN, se ha propuesto que incrementar los niveles de esta proteína puede ser una buena estrategia terapéutica para el tratamiento de la DLFT.

Se han descrito diferentes compuestos capaces de aumentar los niveles de PGRN, aunque su mecanismo de acción es diferente. Por un lado están los compuestos capaces de aumentar la expresión del gen que codifica para PGRN, ya sea inhibiendo las histona deacetilasas (HDAC) como SAHA (*Suberanilohydroxamic acid*) o resveratrol (Cenik, et al., 2011) o el mediante el control de las modificaciones epigenéticas que están regulando la

expresión de *GRN* (Banzhaf-Strathmann J, 2013, Galimberti, *et al.*, 2013, Nguyen, *et al.*, 2013). También se ha descrito, que algunos micro ARNs como miR-29b o miR-107 son capaces de incrementar los niveles de PGRN a través de la expresión de *GRN* (Jiao, *et al.*, 2010, Kocerha, *et al.*, 2011, W.X. Wang, *et al.*, 2010). Por otro lado, también existen compuestos capaces de inhibir la degradación del ARNm de PGRN. En este sentido existen dos ensayos clínicos en fase II y III, para el tratamiento de la distrofia de Duchenne y la fibrosis quística, con el compuesto PTC124, un estabilizador del ARN mensajero que se puede suministrar por vía oral (Du, *et al.*, 2013, Welch, *et al.*, 2007). Otros compuestos son capaces de aumentar los niveles de PGRN independientemente de su expresión. Así, algunos agentes alcalinizantes, inhibidores selectivos de la ATPasa vacuolar, como cloroquina, amiodarona o Bafilomicina A1 (BafA1), son capaces de aumentar los niveles de PGRN a través de un mecanismo post-traducciona independiente de la degradación lisosomal, autofagia o endocitosis (Capell, *et al.*, 2011). Otras evidencias muestran que la sobreexpresión de PDI4 (*Protein disulfide isomerase 4*), una chaperona encargada del correcto plegamiento de las proteínas, es capaz de aumentar la cantidad de PGRN secretada en células en cultivo (Almeida, *et al.*, 2011) y que la adición de PGRN recombinante exógena podría ser efectiva en el tratamiento de la DLFT (Nguyen, *et al.*, 2013). Algunos de los compuestos capaces de aumentar los niveles de PGRN ya se están usando en otras enfermedades, por ejemplo cloroquina se usa para el tratamiento de la malaria y bepridil y amiodarona son usadas en el tratamiento de las anginas de pecho (Capell, *et al.*, 2011, Solomon y Lee, 2009).

Debido a que la PGRN es una proteína de secreción, se ha propuesto que el uso de drogas dirigidas a los receptores de esta proteína podrían ser eficaces en el tratamiento de la DLFT. Como ya se ha descrito anteriormente, se cree que sortilina 1 (SORT1) y TNFR (*Tumor necrosis factor receptor*) pueden ser los receptores de PGRN (F. Hu, *et al.*, 2010, Tang, *et al.*, 2011). Después de su unión a SORT1, la PGRN es endocitada y degradada en el lisosoma. Diferentes trabajos aportan evidencias de que este receptor es capaz de regular los niveles de PGRN extracelular, por ejemplo se han descrito variantes del gen de SORT1 capaces de regular los niveles de PGRN en plasma (Carrasquillo, *et al.*, 2010) y

se ha demostrado que el bloqueo de la expresión de *SORT1* es capaz de normalizar la deficiencia de PGRN de un ratón *GRN*^{-/-} (Gass, *et al.*, 2012). Estos resultados sugieren que el bloqueo de *SORT1* puede ser una buena diana terapéutica para el tratamiento de la DLFT ya que permitiría aumentar los niveles de PGRN circulante. Así por ejemplo, se ha descrito que la adición de un péptido que contiene el fragmento C-terminal de la PGRN es capaz de competir con la PGRN endógena para unirse a *SORT1* (F. Hu, *et al.*, 2010, Zheng, *et al.*, 2011). Recientemente se ha propuesto que la PGRN puede actuar como un antagonista de *TNFα* debido a que se ha descrito que es capaz de unirse al receptor 2 (*TNFR2*) del factor de necrosis tumoral (Tang, *et al.*, 2011) con mayor afinidad que *TNFα*. De esta manera, la deficiencia de PGRN facilitaría la unión de *TNFα* a su receptor aumentando así la neuroinflamación y consiguiente neurodegeneración en la DLFT. Se ha diseñado un péptido con los sitios de unión de la PGRN a *TNFR* (atsttrina) que puede prevenir la inflamación asociada a la pérdida de PGRN en un modelo de ratón de artritis inflamatoria (Tang, *et al.*, 2011) sugiriendo que podría ser un posible tratamiento para la DLFT. Sin embargo, algunos estudios recientes no muestran evidencia de la unión de PGRN a *TNFR* (Chen, *et al.*, 2013) por lo que es necesario conocer más acerca de la relación de la PGRN y *TNFα* en el SNC para poder desarrollar terapias específicas.

Además, como ya se ha descrito en apartados anteriores, la PGRN es capaz de regular un gran número de funciones celulares a través de su interacción, dentro y fuera de la célula, con rutas de señalización como *PI3K/Akt*, *MAPK* y *p70S6* (He y Bateman, 2003, Monami, *et al.*, 2006, Zanicco-Marani, *et al.*, 1999), por lo tanto la modulación de estas rutas podría ser un tratamiento efectivo para la DLFT. Recientemente, se ha descrito que la deficiencia de PGRN también está implicada en la sobreactivación de la ruta de señalización de *Wnt* (Rosen, *et al.*, 2011) por lo que se cree que la inhibición de esta ruta podría ser una potencial estrategia terapéutica para el tratamiento de la DLFT (Korade y Mirnics, 2011).

Tabla 6: Compuestos con potencial terapéutico para el tratamiento de la DLFT asociada a mutaciones en GRN

Diana	Mecanismo Propuesto	Moléculas candidatas
Progranulina	Aumento de la expresión de GRN	ProgranulinaDianaInhibición de histona deacetilasas (HDAC)
		Vorinostat (SAHA) Resveratrol
		Inhibición de la degradación del ARN mensajero
		PTC124
		Inducción de un trasgen exógeno
	Aumento de los niveles intracelulares de PGRN	Terapia de reemplazamiento génico viral
		Control de la expresión de GRN por miARN
		miR-29b miR-107
	Aumento de los niveles de PGRN extracelular	Modificaciones epigenéticas
		-
		Inhibición de la ATP-asa vacuolar
	Inhibición de rutas de señalización activadas por PGRN	Bafilomicina A1 (BafA1) Cloroquina Bepredil Amiodarona
		Control del correcto plegamiento de las proteínas
		Sobreexpresión de PDI4
	Inhibición de rutas de señalización activadas por PGRN	Péptidos que compiten por la unión al receptor de sortilina
		Péptido del fragmento C-terminal de PGRN
	Inhibición de rutas de señalización activadas por PGRN	Adición de PGRN recombinante
		-
	Inhibición de rutas de señalización activadas por PGRN	Bloqueo de la vía de señalización WNT
		Antagonistas de WNT

7.2.3. Terapias dirigidas al tratamiento de la DLFT-TDP

Los depósitos de TDP-43 son la marca patológica de la DLFT-TDP. En la mayoría de los casos estas inclusiones van asociadas a mutaciones en el gen *GRN* aunque también se encuentran inclusiones de TDP-43 en la DLFT asociada a mutaciones en *VCP* y *C9ORF72* (Eriksen y Mackenzie, 2008,Gitcho, *et al.*, 2009b,Mackenzie, *et al.*, 2013) así como en otras enfermedades como la ELA (Barmada y Finkbeiner, 2010). Como ya se ha descrito, la patología de TDP-43 se caracteriza por una hiperfosforilación, ubiquitinación, corte en fragmentos C-terminales y la translocación de la proteína desde el núcleo al citoplasma

(Neumann, *et al.*, 2006). La búsqueda de aproximaciones terapéuticas se centra fundamentalmente en la modificación farmacológica de los mecanismos que controlan la distribución subcelular de la proteína, así como la ubiquitinación, fosforilación y procesamiento anómalo de TDP-43.

Algunas de las estrategias propuestas para el tratamiento de la DLFT asociada a inclusiones de TDP-43 son similares a las propuestas para el tratamiento de las taupatías. Por ejemplo se ha descrito que la activación de la autofagia puede ser un tratamiento efectivo en la DLFT-TDP, en este sentido en un trabajo reciente han visto que el tratamiento con rapamicina es capaz de reducir la pérdida neuronal en el lóbulo frontal y mejorar el aprendizaje y las funciones motoras en un modelo de ratón de DLFT-TDP (Wang, *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha descrito que el uso de vacunas o anticuerpos capaces de neutralizar TDP-43 pueden ser usados en el tratamiento de la DLFT asociada a inclusiones de esta proteína. La TDP-43 fosforilada es más propensa a agregarse, por lo que la inhibición de las kinasas encargadas de fosforilar específicamente a TDP-43 podría ser una buena estrategia terapéutica. No se sabe mucho de las kinasas encargadas de fosforilar a TDP-43, aunque recientemente se ha visto que CDC7, una kinasa relacionada con el ciclo celular, es capaz de fosforilar a TDP-43 en sus sitios patogénicos. Por lo tanto el uso de inhibidores específicos de CDC7 serían un posible tratamiento para la DLFT-TDP (Liachko, *et al.*, 2013).

TDP-43 es una proteína de unión a ADN/ARN cuyas funciones principales están relacionadas con la regulación de la expresión génica (Buratti y Baralle, 2001, Crozat, *et al.*, 1993). Se ha descrito que es esencial identificar moléculas capaces de modificar las funciones patológicas de las proteínas de unión a ADN/ARN entre las que se encuentra TDP-43, pero también otras proteínas relacionadas con la patología de la DLFT como FUS, para poder desarrollar nuevas terapias para el tratamiento de la DLFT (Sun, *et al.*, 2011). Por otro lado algunos trabajos recientes sugieren un posible esparcimiento de la enfermedad a través de diferentes regiones del cerebro con un mecanismo similar al de los priones (Clavaguera, *et al.*, 2009, Verma, 2013). Interesantemente, tanto TDP-43 como FUS muestran un “dominio prion” muy similar al específico de las proteínas prion, lo que hace que las for-

mas patológicas de la proteína puedan propagarse hacia tejidos o células sanas (Cushman, et al., 2010, Fornai, et al., 2011, Fuentealba, et al., 2010, King, et al., 2012, Liu-Yesucevitz, et al., 2010, Nonaka, et al., 2013). Estas observaciones sugieren la necesidad de que los tratamientos terapéuticos contemplen la forma de prevenir la expansión de la enfermedad (Cushman, et al., 2010).

7.2.4. Otras posibles dianas moleculares

Además de las mutaciones en *GRN* y *MAPT*, se han descrito formas menos frecuentes de la DLFT asociadas a mutaciones en otros genes como *VCP*, *CHMP2B* y *C9ORF72*.

Las mutaciones en *VCP* están asociadas con la enfermedad de Paget y DLFT (Watts, et al., 2004). *VCP* es una proteína que está involucrada en muchos procesos celulares incluyendo la formación post-mitótica del Golgi, la reparación de daños del ADN y la degradación de proteínas vía el sistema ubiquitina-proteasoma y retículo endoplasmático (Waugh, et al., 2003, Wojcik, 2002). Los recientes descubrimientos que sugieren que alteraciones en la degradación de proteínas a través del sistema ubiquitina-proteasoma y la autofagia podrían ser la causa patológica asociada mutaciones en *VCP* nos hacen pensar que la modulación de los sistemas de degradación de proteínas podrían ser una buena diana terapéutica para tratar la DLFT asociada a mutaciones en *VCP* (Ju y Weihl, 2010). Además, las mutaciones de pérdida de función en *VCP* causan estrés oxidativo, apoptosis dependiente de la mitocondria (Braun y Zischka, 2008) y la presencia de un alelo de apolipoproteína E4 (ApoE4) más comprometido a desarrollar DLFT (Mehta, et al., 2007), sugiriendo que apoE4 es un modificador genético implicado en la presentación clínica de la DLFT y por lo tanto se ha propuesto terapias contra apoE4 como posibles tratamientos en la DLFT (Mahley, et al., 2006).

Las mutaciones en *C9ORF72* están relacionadas con diferentes enfermedades neurodegenerativas como la EA y ELA y DLFT-TDP. Esta alteración genética consiste en una repetición patológica de hexanucleótidos en el marco de lectura y se ha sugerido que perturba el metabolismo del ARN mensajero induciendo su acumulación y toxicidad (DeJesus-Hernandez, *et al.*, 2011, Fratta, *et al.*, 2012). Los posibles tratamientos para la DLFT asociada a mutaciones en este gen van desde drogas capaces de aumentar los niveles de la proteína no mutada a tratamientos de inmunoterapia contra TDP-43 que sean capaces de disminuir los niveles de TDP-43 patológica. Además, se ha propuesto la posibilidad de eliminar las expansiones patológicas de ARN usando oligonucleótidos de ARN antisentido que pueden eliminar la proteína mutada.

Degeneración Lobar Frontotemporal asociada a mutaciones en progranulina

8

Modelos de estudio

El problema fundamental en el estudio de la DLFT es que el tejido nervioso disponible proviene de material de autopsia, frecuentemente procedente de casos terminales de patología avanzada. En estos casos, es imposible separar aquellos eventos causales de otros inespecíficos que se deriven de la pérdida celular provocada por la enfermedad. Además, el uso de material de autopsia dificulta el estudio de los procesos patológicos iniciales a nivel celular y/o molecular. Por este motivo, el desarrollo de modelos animales y celulares que presentan las características genéticas y patológicas de la DLFT ha sido fundamental para el estudio de la enfermedad así como para identificar posibles dianas terapéuticas y para probar la eficacia de diferentes tratamientos.

8.1. Modelos Animales

Hasta la fecha se han desarrollado diferentes modelos animales para el estudio de la DLFT. Es común el uso del nematodo *C. elegans* para el estudio de diferentes enfermedades neurodegenerativas (Li y Le, 2013) entre las que se encuentra la DLFT (Boyd, *et al.*, 2013, Vaccaro, *et al.*, 2012). De todos los genes que han sido ligados a formas familiares de DLFT, sólo *CHMP2B* no tiene homólogos en *C. elegans*, lo que significa que este organismo es un buen modelo para el estudio de la patofisiología de la enfermedad y para la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas. Se han generado gusanos transgénicos capaces de expresar las proteínas humanas TDP-43 y tau que han servido para estudiar la formación de los agregados patogénicos y su neurotoxicidad (Ash, *et al.*, 2010, Brandt, *et al.*, 2009, Guthrie, *et al.*, 2009, Liachko, *et al.*, 2010). Además de modelar la enfermedad, este organismo puede ser usado para caracterizar nuevas funciones de proteínas relacionadas con la DLFT. Por ejemplo, usando este nematodo se ha identificado una nueva función de la PGRN en la regulación la cinética de la apoptosis (Kao, *et al.*, 2011). También en *Drosophila* se han identificado homólogos de muchos de los genes que causan los síndromes autosómicos de la DLFT como *VCP*, *TARDBP* y *MAPT*. Estos modelos son muy útiles para estudiar los mecanismos patogénicos de la enfermedad con mutaciones puntuales y para

identificar posibles dianas terapéuticas debido a su baja relación coste/beneficio y a que tienen ciclos vitales cortos (Diaper, *et al.*, 2013, Gistelinck, *et al.*, 2012, N.C. Kim, *et al.*, 2013).

El pez cebra (*Danio rerio*) es un modelo usado fundamentalmente para el estudio del desarrollo de los vertebrados que también es útil en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas ya que contiene sistemas neuroquímicos, neuronas especializadas y células de la glía. Muchos de los genes implicados en las enfermedades neurodegenerativas humanas tienen ortólogos en el pez cebra (Sager, *et al.*, 2010) y además se ha conseguido que exprese proteínas humanas como tau, por lo que se pueden usar estos modelos para replicar aspectos moleculares de la DLFT (Bai y Burton, 2011).

Los ratones transgénicos son el modelo más comúnmente usado en el estudio de la DLFT. En ellos se pueden estudiar distintas marcas patogénicas y características clínicas de la enfermedad como la neuroinflamación o los cambios de comportamiento. Hasta la fecha se han creado varias líneas de ratones transgénicos que presentan mutaciones en *MAPT*, *GRN*, *TARDBP*, *VCP* y *CHMP2B*. La lista de todas las líneas transgénicas de ratón se pueden encontrar en la página de Alzforum (<http://www.alzforum.org/res/com/tra/>).

Se han creado más de 25 líneas de ratones transgénicos que expresan la proteína tau humana con mutaciones ligadas a la DLFT. Con la excepción de unas pocas líneas que expresan mini genes, la mayoría de los ratones transgénicos de tau expresan la variante 4R de la proteína, con o sin los insertos N-terminales (Noble, *et al.*, 2010). No todas las líneas presentan fenotipos similares a la enfermedad humana, aunque a pesar de ello sí que se observa la disfunción cognitiva que precede a la neurodegeneración además de déficits en la plasticidad sináptica (Ramsden, *et al.*, 2005). Con estos modelos de ratón se ha demostrado por ejemplo que la neurodegeneración y los déficits cognitivos están asociados a la formación de ovillos neurofibrilares (Santacruz, *et al.*, 2005) y actualmente se están usando para el estudio preclínico de gran cantidad de terapias potenciales para el tratamiento de la DLFT-TAU (Noble, *et al.*, 2010).

Hasta la fecha se han generado varios modelos de ratón para entender las funciones de TDP-43. En ellos, se ha visto que la delección total de la proteína es letal desde las primeras etapas del desarrollo embrionario mientras que los animales heterocigotos presentan niveles normales de TDP-43 sin presentar una neuropatología clara, lo que limita la utilidad de este tipo de ratones (Kraemer, *et al.*, 2010, Sephton, *et al.*, 2010, Wu, *et al.*, 2010). En otros modelos se usan promotores heterólogos para expresar la TDP-43 humana a través del sistema nervioso del ratón generando un fenotipo que presenta fallos motores severos y que lleva a la muerte en semanas o meses (Wegorzewska, *et al.*, 2009, Xu, *et al.*, 2010). Además, éstas líneas de TDP-43 presentan marcas patológicas características de la DLFT como inclusiones neuronales ubiquitin positivas, astrogliosis y pérdida de las neuronas piramidales de la corteza frontal (Seeley, *et al.*, 2006, Tsuchiya, *et al.*, 2002). También se han creado líneas de ratones que expresan TDP-43 en las neuronas del cerebro anterior, éstas líneas presentan signos neurodegeneración y alteraciones en el comportamiento (Tsai, *et al.*, 2010). La presencia de fenotipos relacionados con la DLFT, hace que estos modelos de ratón sean importantes para el estudio de los mecanismos por los que TDP-43 contribuye a la neurodegeneración. Sin embargo, aunque muchas líneas exhiben marcas patológicas propias de la DLFT-TDP como la presencia de inclusiones intranucleares o citoplasmáticas y fragmentos C-terminales de TDP-43, ninguna de estas marcas correlacionan bien con la presencia de déficits funcionales, sugiriendo que algún otro mecanismo podría ser necesario para la progresión de la enfermedad.

Para examinar el papel de la PGRN en el SNC, algunos grupos han generado ratones *knockout* de PGRN con los que se ha descubierto un posible papel de esta proteína en el desarrollo sexual del cerebro. En ese caso, los ratones deficientes en PGRN presentan anomalías tempranas en el comportamiento social sin deterioro en la salud general ni en la función motora, aunque sí parecen presentar características similares a depresión y desinhibición así como problemas en el aprendizaje (Ghoshal, *et al.*, 2012, Kayasuga, *et al.*, 2007, Yin, *et al.*, 2010b). Con la edad, los ratones desarrollan una neuropatología caracterizada por acumulación de proteínas ubiquitinizadas, lipofuscinosis, microgliosis y as-

trocitosis (Ahmed, *et al.*, 2010) además de presentar alteraciones en la conectividad y plasticidad sináptica (Tapia, *et al.*, 2011). El problema de estos modelos es que, aunque muestren muchas de las características fenotípicas de la DLFT, son nulos para GRN mientras que en los humanos, la deficiencia completa de la proteína causa una enfermedad diferente a la DLFT (lipofuscinosis ceroides neuronal) (Smith, *et al.*, 2012).

También existen algunos modelos de ratón que presentan mutaciones en otros genes relacionados con la DLFT como *VCP* y *CHMP2B*. Recientemente se han generado dos líneas transgénicas y una *knock-in* que presentan mutaciones en *VCP* (Badadani, *et al.*, 2010, Custer, *et al.*, 2010). Estos modelos muestran perturbaciones en el músculo, hueso y cerebro similares a las encontradas en el síndrome humano IBMPFD o enfermedad de Paget. Estos ratones muestran alteraciones en el comportamiento, ansiedad, problemas para reconocer objetos y convulsiones. Se ha observado gliosis y pérdida nuclear de TDP-43 acompañada de acumulación citosólica de formas ubiquitinizadas de la proteína, por lo que estas líneas pueden ser útiles para estudiar como las mutaciones en *VCP* pueden afectar a TDP-43 y causar pérdida neuronal. En cuanto a las mutaciones en *CHMP2B*, se han generado ratones que expresan el intrón 5 de la proteína (*CHMP2B*^{intron5}). Estos ratones desarrollan inclusiones de proteínas ubiquitinizadas que son negativas para TDP-43 y FUS, que se corresponderían con la patología de DLFT-UPS característica de pacientes con mutaciones en el gen *CHMP2B* (Skibinski, *et al.*, 2005). Los ratones desarrollan hinchazón axonal y presentan reducción de la supervivencia. Ninguna de estas anomalías se ha visto en ratones que sobre expresan la *CHMP2B* completa o que son *knockout* para esta proteína, lo que nos hace pensar que el efecto de ganancia de función lo hace solo la isoforma *CHMP2B*^{intron5} (Ghazi-Noori, *et al.*, 2012).

8.2. Modelos Celulares

Uno de los principales problemas en el estudio de la DLFT y el desarrollo de nuevas terapias ha sido que los modelos animales no siempre presentan las características fenotípicas propias de la enfermedad. Una forma fácil de abordar el estudio de la DLFT es el uso de líneas celulares establecidas en las que se han inducido alteraciones que hacen que reproduzcan alguna de las características patológicas de la enfermedad. En la mayoría de los trabajos se usan líneas celulares de neuroblastoma humano como SH-SY5Y en los que se desarrolla la patología de tau (Furukawa, *et al.*, 2000) o TDP-43 (Nonaka, *et al.*, 2009a), aunque también hay trabajos realizados usando modelos celulares procedentes de tejidos no neuronales como células HEK (Jiao, *et al.*, 2010) o células HeLa (Lee, *et al.*, 2012).

La mejor forma de estudiar una determinada enfermedad es usar células o tejidos afectados de pacientes. Debido a la dificultad de obtener las células nerviosas, el uso de células extraneurales de pacientes es una estrategia complementaria y alternativa en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas. El uso de este tipo de células se basa en estudios que muestran que las alteraciones asociadas a desordenes neurológicos son un fenómeno general que afecta también a células no neuronales (Etcheberrigaray y Ibarreta, 2001, Gibson y Huang, 2002, Ibarreta, *et al.*, 1997, Miller, *et al.*, 2013, Rossi, *et al.*, 2013, Rossi, *et al.*, 2008, van der Zee, *et al.*, 2011). Aunque tengan menos importancia clínica, las manifestaciones sistémicas de las enfermedades neurodegenerativas permiten el estudio de aspectos fisiopatológicos relevantes en células y tejidos de más fácil acceso que el tejido nervioso. Los principales tejidos periféricos que se usan para el estudio de las enfermedades neurodegenerativas son células sanguíneas (linfocitos o plaquetas) y fibroblastos. Diferentes evidencias indican que los linfocitos pueden ser un buen modelo para el estudio de las enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo el uso de linfocitos procedentes de pacientes de alzhéimer ha permitido identificar alteraciones en el ciclo celular (Bartolome, *et al.*, 2009, Bialopiotrowicz, *et al.*, 2012, de las Cuevas, *et al.*, 2003, Esteras, *et al.*, 2013, Munoz, *et al.*, 2008, Song, *et al.*, 2012), mitocondriales y en el estrés oxidativo

(Sultana, *et al.*, 2011) relacionadas con la enfermedad. Por otro lado, usando este modelo celular también se han identificado variaciones en la homeostasis del calcio (Ibarreta, *et al.*, 1997) o la alteración en genes relacionados con la patología de la EA (Cheung, *et al.*, 2010). En relación con la DLFT, hasta la fecha hay menos trabajos en los que usan células extraneurales de pacientes, aunque sí hay estudios donde el uso de linfocitos o fibroblastos han servido para identificar mutaciones en genes asociados a la DLFT como por ejemplo *MAPT* (Rossi, *et al.*, 2013, Rossi, *et al.*, 2008) *TARDBP* (van der Zee, *et al.*, 2011) y *GRN* (Cappell, *et al.*, 2011, Chiang, *et al.*, 2008).

Por otro lado, los fibroblastos procedentes de pacientes pueden ser usados para generar células madre pluripotentes inducidas (células iPS, por sus siglas en inglés: “*Induced Pluripotent Stem Cells*”) capaces de diferenciarse a la mayoría de los tejidos (Yu, *et al.*, 2007). Esta tecnología se basa en la expresión de cuatro genes, *Oct3/4*, *SOX2*, *NANOG* y *c-Myc* mediante el uso de un sistema retroviral (Takahashi, *et al.*, 2007). También se han desarrollado otros métodos de reprogramación sin integración retroviral, por ejemplo a través de la expresión de agregados de micro ARN como miR302/367 (Anokye-Danso, *et al.*, 2011). Se han generado múltiples líneas celulares iPS a partir de pacientes diagnosticados de DLFT con mutaciones en *GRN*, *MAPT* y *C9ORF72* así como a partir de individuos control o casos esporádicos de la enfermedad (Almeida, *et al.*, 2013, Almeida, *et al.*, 2012). Las líneas celulares iPS y sus derivados, como por ejemplo neuronas humanas específicas de paciente, proveen un nuevo sistema de estudio y de desarrollo de tratamientos, complementario a los ya existentes modelos celulares y animales. La eficacia y la toxicidad de los compuestos que pueden por ejemplo aumentar los niveles de PGRN ahora pueden ser testadas en neuronas humanas derivadas de células iPS portadoras de mutaciones en *GRN*. De forma similar, compuestos que son capaces de disminuir los niveles de tau pueden ser testados en cultivos de neuronas humanas derivadas de células iPS portadoras de mutaciones en *MAPT*.



Objetivos

1

Objetivos

El objetivo fundamental de esta tesis ha sido desvelar la posible contribución de los fallos en el control de los mecanismos que regulan la supervivencia/muerte celular a la neurodegeneración característica de la degeneración lobar frontotemporal (DLFT) asociada al déficit de progranulina.

Nuestra hipótesis de trabajo parte de la base de que las alteraciones en los mecanismos de control del ciclo de división celular pueden estar asociadas con la muerte neuronal característica de las enfermedades neurodegenerativas. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que se ha encontrado una expresión anómala de proteínas reguladoras del ciclo celular y evidencias directas de replicación del ADN en biopsias *post mortem* de pacientes de diversas enfermedades neurodegenerativas, así como observaciones *in vitro* de que la expresión ectópica de alguna de estas proteínas en cultivos neuronales causa la muerte celular por apoptosis.

En esta tesis pretendemos estudiar los mecanismos de regulación del ciclo celular y apoptosis en linfocitos inmortalizados de pacientes de DLFT portadores de la mutación c.709-1G>A en el gen *GRN*. Asumimos, basándonos en trabajos previos de nuestro y de otros laboratorios, que las enfermedades que afectan al sistema nervioso central tienen también manifestaciones sistémicas y por tanto, su estudio puede aportar algunas claves sobre el proceso neurodegenerativo. Por otra parte, creemos que el conocimiento de los factores responsables de la perturbación funcional del ciclo celular y apoptosis podría ayudar a diseñar estrategias terapéuticas dirigidas a impedir la entrada en ciclo celular o a provocar la detención del mismo en algún punto de control que permita la rediferenciación de las neuronas afectadas.

Los objetivos concretos que se proponen son los siguientes:

- 1.- Establecer líneas linfoblásticas mediante la transformación de linfocitos, con el virus de Epstein-Barr, de individuos portadores de la mutación en *GRN* c.709-1G>A, pacientes diagnosticado de demencia frontotemporal, individuos asintómicos y donantes controles, para realizar estudios funcionales y como plataforma para la evaluación de posibles tratamientos farmacológicos.

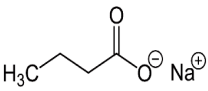
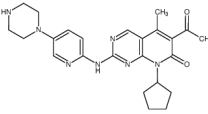
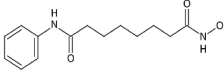
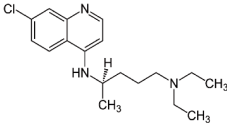
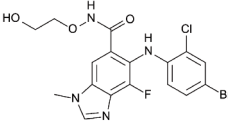
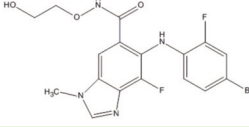
- 2.- Estudiar de forma comparativa la actividad proliferativa y la vulnerabilidad de estas células frente a determinados estímulos
- 3.- Estudiar la influencia del déficit de progranulina (PGRN) en las vías de señalización implicadas en el control de supervivencia/muerte celular.
- 4.- Identificación de posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de la DLFT asociada a las mutaciones en *GRN*.



Material y Métodos

El grueso de los materiales y métodos empleados en la realización de esta tesis se exponen en los artículos correspondientes (1-4). En esta sección, describimos con más detalle el principal modelo celular, linfocitos inmortalizados con el Virus de Epstein-Barr, así como las características de los individuos usados en este estudio. Por otro lado, en la tabla 7 se presenta un resumen de las drogas con posible potencial terapéutico para el tratamiento de la DLFT usadas en este trabajo. Cabe destacar que todas estas drogas ya han sido usadas o están en alguna fase de ensayo clínico para el tratamiento de diferentes enfermedades.

Tabla 7: Resumen de los compuestos con potencial terapéutico para el tratamiento de la DLFT que se han usado en este trabajo.

Nombre	Diana	Estructura	Uso en clínica
Butirato de Sodio	Inhibidor de HDAC (Inhibe expresión de CDK6)		En fase 2 para el tratamiento de algunas infecciones del colon como shigelosis y se ha propuesto como tratamiento para el cáncer de colon.
PD332991	Inhibidor selectivo de CDK6/4		En fase 2 de un estudio clínico para el tratamiento del cáncer de mama
Vorinostat; Suberoylanilide Hydroxamic Acid, (SAHA)	Inhibidor de HDAC (Aumenta expresión de GRN)		En fase 2 de un ensayo clínico para el tratamiento del cáncer de mama, colorectal y pulmón
Cloroquina	Agente alcalinizante (Aumenta los niveles de PGRN)		Se usa para el tratamiento de la malaria y está en fase 1 para el tratamiento del cáncer de pulmón
Selumetinib (AZD6244)	Inhibidor de MEK1		En fase 1, 2 y 3 de ensayos clínicos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer
MEK162 (ARRY-438162)	Inhibidor de MEK1/2		En fase 1 de un ensayo clínico para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

1

Establecimiento de las líneas celulares linfoblásticas

El establecimiento de las líneas celulares linfoblásticas se hizo a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidas a partir de sangre total, usando gradientes de densidad en Ficoll-Isopaque (Lymphoprep™), según el procedimiento descrito por Koistinen en 1987 (Koistinen, 1987). El método de separación de las CMSP se basa en que estas células tienen una densidad inferior a la de las células polimorfonucleares (granulocitos) y eritrocitos. La separación en un medio isosmótico de densidad igual a 1,077g/ml, permite que los eritrocitos y granulocitos sedimenten a través del medio y que se forme una banda claramente visible que contiene las CMSP entre la muestra y la interfase medio-muestra como puede verse en la figura 12.

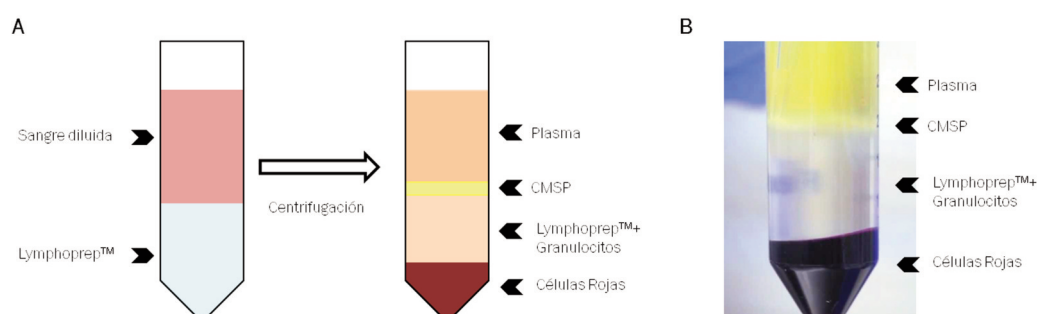


Fig.12. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica. A) Esquema representativo y B) imagen real de las fases de separación obtenidas tras la centrifugación en un gradiente de Ficoll-Isopaque (Lymphoprep™).

El establecimiento de las líneas celulares linfoblásticas se realizó a partir de la población de CMSP, infectando los linfocitos con el virus de Epstein-Barr (EBV) (Steinitz y Klein, 1980). El EBV usado en las transformaciones se obtuvo a partir de una línea celular de linfoma de Burkitt (B-95-6) cedida por Longina Akhatat (National Institute of Alcohol and Abuse Disorders, NIH, Bethesda, USA). Además del virus de Epstein-Barr se añadió 1µg/ml de ciclosporina para evitar la activación de los linfocitos T presentes en la población que pudiera impedir proliferación de los linfocitos B infectados. Al cabo de 3 o 4 semanas comenzaron a aparecer los primeros clones linfoblásticos. Una vez transformadas, las células se crecie-

ron en suspensión y cuando se obtuvo la cantidad suficiente se congelaron en nitrógeno líquido, en 1 ml de medio de cultivo con 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO). Para comenzar a trabajar, las células se descongelaron, se retiró el medio con DMSO y se cultivaron en suspensión a una concentración inicial de 1×10^6 células $\times \text{ml}^{-1}$ en frascos de cultivo de 25 cm^2 en posición vertical dentro de un incubador húmedo, con 5% de CO_2 y a 37°C de temperatura. El medio de cultivo utilizado fue RPMI-1640 (Invitrogen), suplementado con 1% L-glutamina 2mM, 1% penicilina/estreptomicina (Invitrogen) y, a menos que se indique lo contrario, 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS). Este medio se reemplazó de manera rutinaria dos veces por semana.

2

Características, diagnóstico y selección de los individuos

Todos los donantes de sangre a partir de los cuales se han originado las líneas linfoblásticas usadas en este trabajo son originarios del País Vasco y en su mayoría pertenecen a 5 familias en las que hay individuos sanos que no presentan la mutación en el gen *GRN* que se han usado como control e individuos portadores de la mutación c.709-1G>A, tanto asintomáticos como diagnosticados de DLFT. La figura 13 muestra los árboles genealógicos de las familias usadas en este trabajo.

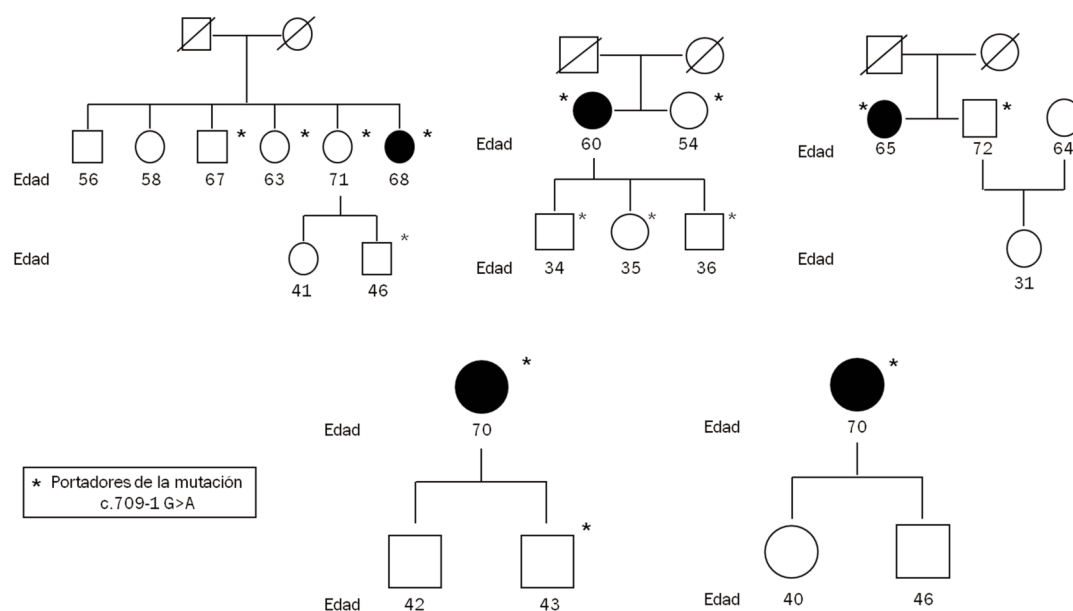


Fig. 13. Descripción de las familias donantes de sangre. Los individuos donantes de sangre pertenecen a cinco familias. Los enfermos de DLFT están representados en color negro y la presencia de la mutación c.709-1G>A está indicada con un asterisco (*). Los cuadrados representan a las mujeres y los círculos a los hombres.

2.1. Características clínicas

Todos los pacientes incluidos en este trabajo fueron diagnosticados de DLFT por cinco neurólogos expertos del hospital de Donostia, aplicando los criterios establecidos (Litvan, et al., 2003, McKeith, et al., 2005, McKhann, et al., 2001) y a partir del estudio de las características clínicas, imágenes de resonancia magnética y PET además de otros test complementarios.

La clasificación clínica de los pacientes se hizo en función del orden de aparición y severidad de los diferentes síndromes asociados a la DLFT (Kertesz, *et al.*, 2005). La tabla 8 muestra algunas características de los individuos usados en este estudio como su edad, género, edad de inicio de la enfermedad y presentación clínica. El curso de la enfermedad es bastante similar en la mayoría de los enfermos y se caracteriza por una progresión relativamente rápida de la demencia asociada a diferentes síndromes clínicos en función del patrón de atrofia cerebral. Así, los pacientes presentan APPNF si la atrofia cerebral es predominante en el lóbulo frontotemporal izquierdo, DFT-vc si es en el derecho y SCB si es predominantemente parietal. Además la mayoría de los individuos presentan antecedentes familiares de la enfermedad.

Como se muestra en la tabla 8, un total de 28 individuos han sido usados en este trabajo, de los cuales 10 son controles asintomáticos y 18 son portadores de la mutación c.709-1G>A (11 asintomáticos y 7 diagnosticados de DLFT). La sangre de estos individuos se obtuvo después de la firma del consentimiento informado por parte de los pacientes o sus familiares.

Tabla 8: Características clínicas y demográficas de los individuos usados para generar las líneas linfoblásticas usadas en este trabajo.

Caso	Sexo	Edad	Edad de inicio	Presentación clínica	Portador mutación c.709-1G>A	Antecedentes familiares
C4	F	41	-	Sano	No	APP, DFT
C6	M	42	-	Sano	No	SCB
C8	M	46	-	Sano	No	APP, DFT
C13	M	70	-	Sano	No	-
C14	M	56	-	Sano	No	SCB, DFT
C15	F	41	-	Sano	No	SCB, DFT
C18	F	58	-	Sano	No	SCB, DFT
C20	M	69	-	Sano	No	-
C22	F	64	-	Sano	No	-
C23	F	31	-	Sano	No	DFT-vc, SCB
p2	F	35	-	Sano	Sí	DFT-vc
p7	F	44	-	Sano	Sí	SCB, DFT-vc
p9	M	43	-	Sano	Sí	-
p12	F	63	-	Sano	Sí	SCB, DFT-vc
p16	F	71	-	Sano	Sí	-
p17	M	46	-	Sano	Sí	SCB, DFT-vc
p19	M	67	-	Sano	Sí	SCB, DFT-vc
p21	M	72	-	Sano	Sí	SCB, DFT-vc
p27	M	36	-	Sano	Sí	DFT-vc, SCB
p28	M	34	-	Sano	Sí	DFT-vc
p29	F	54	-	Sano	Sí	DFT-vc
P5	F	70	64	DFT-vc, SCB	Sí	-
P10	F	70	65	APNF, SCB	Sí	DFT
P11	F	68	-	SCB, DFT	Sí	SCB, DFT
P25	F	65	63	DFT-vc, SCB	Sí	-
P26	F	60	57	DFT-vc	Sí	DFT-vc
P30	F	54	54	DFT-vc	Sí	-
P31	F	70	63	DFT-vc, SCB	Sí	-

2.2. Características neuropatológicas:

La presencia de marcas patológicas características en el cerebro de enfermos de DLFT sirve para confirmar el diagnóstico en los casos familiares de la enfermedad.

En el estudio neuropatológico del cerebro de un paciente de DLFT con la mutación c.709-1G>A (Lopez de Munain, *et al.*, 2008) se identificó una visible pérdida neuronal así como gliosis astrocítica en la corteza frontal, temporal, insular y cingulada, normalmente acompañada de espongiosis en la capa II de la corteza cerebral. La pérdida neuronal y la gliosis también eran evidentes en el núcleo caudado y putamen (que juntos forman el núcleo estriado). El análisis inmunohistoquímico permitió identificar abundantes inclusiones de proteínas ubiquitinizadas en el citoplasma de las neuronas afectadas, y algunas inclusiones intranucleares (ojos de gato), que eran inmunorreactivas para TDP-43 (Fig. 14).

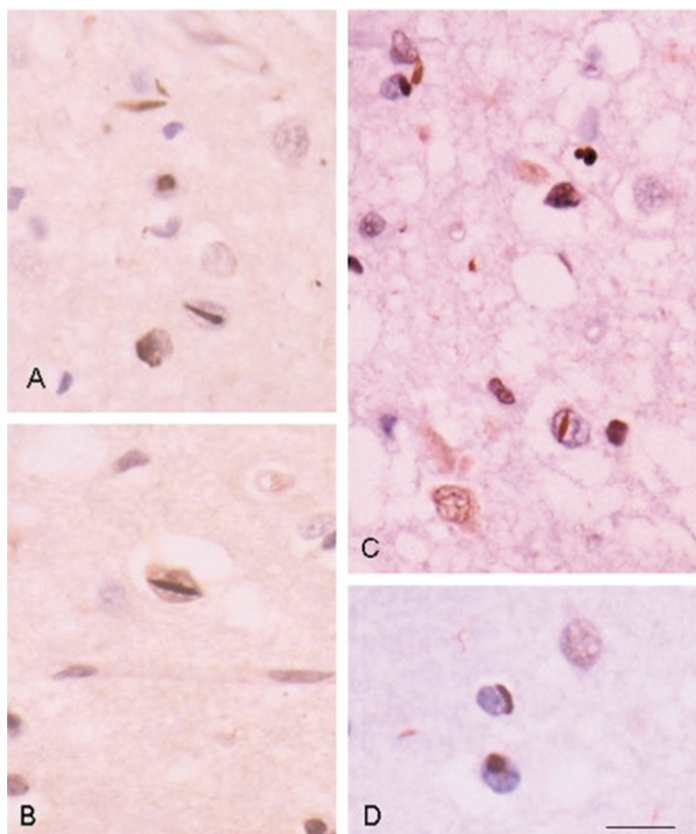


Fig. 14: Análisis inmunohistoquímico del cerebro de un paciente de DLFT asociada a la mutación c.709-1G>A. Neuritas aberrantes, inclusiones intracitoplasmáticas e intranucleares marcadas con anticuerpos anti-ubiquitina (A y B) y anti TDP-43 (C y D). Tomada (López de Munain, *et al.*, 2008).

2.3. Estudio y caracterización de la mutación c.709-1G>A

La secuenciación del gen de la *GRN*, la caracterización de la mutación c.709-1G>A y el análisis de la expresión de dicho gen se realizó en el servicio de neurología del hospital de Donostia en San Sebastián (Lopez de Munain, et al., 2008). Esta mutación puede aparecer asociada a diferentes síndromes clínicos y todos los individuos afectados son originarios del País Vasco.

La mutación c.709-1G>A es una mutación intrónica simple que causa la aparición de una proteína truncada por una alteración del *splicing* del ARN mensajero debido a la sustitución de una G por una A en la posición -1 del extremo 5' del exón 7 (Lopez de Munain, et al., 2008) (Ver figura 14). Esta mutación se encuentra en heterocigosis y se ha descrito que el codón terminación prematuro en la secuencia codificante del alelo mutado resulta en la degradación del ARN mensajero a través del mecanismo denominado *Nonsense-Mediated Decay* (NMD). La expresión relativa del gen de *GRN* en la muestra clínica era significativamente menor en los portadores de la mutación, por lo tanto los resultados del estudio de la expresión de ARN en la sangre periférica confirmaron que la DLFT asociada a la mutación c.709-1G>A en *GRN* parece causar la enfermedad por un mecanismo de haploinsuficiencia de la proteína. No se observaron diferencias en la expresión del gen *GRN* entre los individuos sintomáticos o asintomáticos portadores de la mutación (Lopez de Munain, et al., 2008).

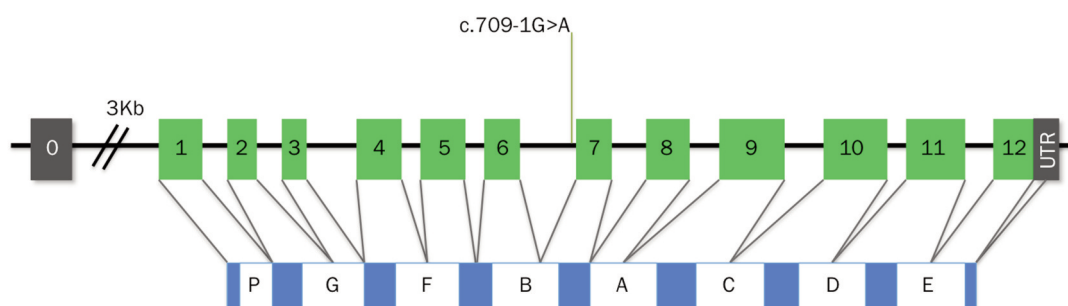


Fig. 15. Localización de la mutación c.709-1G>A en el gen *GRN*



Resultados



Resultados

Los resultados de esta tesis se presentan en Formato Publicaciones y se encuentran descritos en los siguientes artículos:

Artículo #1: Carolina Alquezar, Noemí Esteras, Fernando Bartolomé, José J. Merino, Ainhoa Alzualde, Adolfo López de Munain, Ángeles Martín-Requero. “Alteration in cell cycle-related proteins in lymphoblasts from carriers of the c.709-1G>A PGRN mutation associated with FTLT-TDP dementia”. *Neurobiol Aging* (2012) Feb;33(2):429.e7-20.

Artículo #2: Carolina Alquezar, Noemí Esteras, Ainhoa Alzualde, Fermín Moreno, Matilde Sanchez-Ayuso, Adolfo López de Munain, Ángeles Martín-Requero. “Inactivation of CDK/pRb pathway normalizes survival pattern of lymphoblasts expressing the FTLT-progranulin mutation c.709-1G>A” *PLoS One*. (2012) 7(5):e37057.

Artículo #3: Carolina Alquezar, Noemí Esteras, Ana de la Encarnación, Ainhoa Alzualde, Fermín Moreno, Adolfo López de Munain, Ángeles Martín-Requero. “Alteration in cell cycle-related proteins in lymphoblasts from carriers of the c.709-1G>A PGRN mutation associated with FTLT-TDP dementia”. *Neurobiol Aging* (2013) doi: 10.1016 [Epub ahead of print].

Artículo #4: Carolina Alquezar, Noemí Esteras, Ana de la Encarnación, Fermín Moreno, Adolfo López de Munain, Ángeles Martín-Requero. “The Increase of PGRN levels and blockade of the ERK pathway: Upstream and downstream strategies for the treatment of PGRN deficient frontotemporal dementia” Submitted.

1

Alteración de proteínas reguladoras del ciclo celular en linfoblastos de pacientes de DLFT-TDP portadores de la mutación c.709-1G>A en el gen *progranulina*

Carolina Alquezar, Noemí Esteras, Fernando Bartolomé, José J. Merino, Ainhoa Alzualde, Adolfo López de Munain, Ángeles Martín-Requero.

“Alteration in cell cycle-related proteins in lymphoblasts from carriers of the c.709-1G>A PGRN mutation associated with FTLD-TDP dementia”. *Neurobiol Aging* (2012) Feb;33(2):429.e7-20.

Resumen

La degeneración lobar frontotemporal (DLFT) con inclusiones neuronales de la proteína TDP-43 se asocia en la mayoría de los casos a mutaciones en el gen *progranulina* (*GRN*). Aunque se desconocen los mecanismos por los que la haploinsuficiencia de PGRN induce neurodegeneración, cada vez hay más evidencias de que la entrada en ciclo celular por parte de neuronas postmitóticas precede en muchas ocasiones a la muerte neuronal. Basándonos en las propiedades mitogénicas y neurotróficas de la PGRN, en este trabajo se ha intentado probar la hipótesis de que el déficit de PGRN podría inducir alteraciones en el control del ciclo celular y en la viabilidad neuronal. Dado que las alteraciones del ciclo celular no están restringidas a las neuronas, estudiamos la influencia de la haploinsuficiencia de PGRN en el control del ciclo celular en células extraneuronales de pacientes de DLFT portadores de la mutación c.709-1G>A en el gen *GRN*. Nuestros resultados muestran que el déficit de PGRN aumenta la actividad del ciclo celular, asociada a un aumento en los niveles de la proteína CDK6 y de la fosforilación de pRb, resultando en un fallo de la transición entre las fases G₁/S del ciclo celular. La pérdida de la función nuclear de TDP-43, asociada a la alteración de su distribución celular en los linfoblastos deficientes en PGRN podría ser la responsable del aumento en la expresión de CDK6. Estas características funcionales propias de los linfoblastos portadores de la mutación c.709-1G>A hacen de estas células un excelente modelo experimental no invasivo para el estudio la patogénesis de la DLFT.



Alteration in cell cycle-related proteins in lymphoblasts from carriers of the c.709-1G>A PGRN mutation associated with FTLD-TDP dementia

Carolina Alquezar^a, Noemí Esteras^a, Fernando Bartolomé^a, José J. Merino^b,
Ainhoa Alzualde^{b,c}, Adolfo López de Munain^{b,c}, Ángeles Martín-Requero^{a,d,*}

^a Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain

^b Department of Neurology and Experimental Unit, Hospital Donostia-Instituto Biodonostia, San Sebastián, Spain

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto Carlos III, Spain

^d Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto Carlos III, Spain

Received 27 July 2010; received in revised form 10 November 2010; accepted 21 November 2010

Abstract

Frontotemporal lobar degeneration with neuronal inclusions containing TAR DNA binding protein 43 (TDP-43) is associated in most cases with null-mutations in the progranulin gene (PGRN). While the mechanisms by which PGRN haploinsufficiency leads to neurodegeneration remained speculative, increasing evidence support the hypothesis that cell cycle reentry of postmitotic neurons precedes many instances of neuronal death. Based in the mitogenic and neurotrophic activities of PGRN, we hypothesized that PGRN deficit may induce cell cycle disturbances and alterations in neuronal vulnerability. Because cell cycle dysfunction is not restricted to neurons, we studied the influence of PGRN haploinsufficiency, on cell cycle control in peripheral cells from patients suffering from frontotemporal dementia, bearing the PGRN mutation c.709-1G>A. Here we show that progranulin deficit increased cell cycle activity in immortalized lymphocytes. This effect was associated with increased levels of cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) and phosphorylation of retinoblastoma protein (pRb), resulting in a G₁/S regulatory failure. A loss of function of TDP-43 repressing CDK6 expression may result from altered subcellular TDP-43 distribution. The distinct functional features of lymphoblastoid cells from c.709-1 G>A carriers offer an invaluable, noninvasive tool to investigate the etiopathogenesis of frontotemporal lobar degeneration.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: FTLD; Lymphocytes; Cell cycle; pRb; CDK6; TDP-43

1. Introduction

Frontotemporal lobar degeneration (FTLD) is now a widely recognized form of dementia, characterized by gradual, progressive changes in behavior, personality and/or language with early preservation of memory (Ikeda et al., 2004). It is responsible for at least 20% of presenile cases (Neary et al., 2000). This heterogeneous disease has been of particular interest to geneticists due to its high rate of

heritability with up to 40% of patients reporting a family history of the disease in at least 1 extra family member.

The main clinical presentations of FTLD are: (1) behavioral variant of frontotemporal dementia (bv-FTD), with disinhibition and changes in personality, such as apathy and poor judgment, and (2) language, with a nonfluent aphasia with anomia (primary progressive aphasia [PPA]), or a fluent aphasia with early loss of word meaning (semantic dementia [SD]).

Pathologically, these diseases share deposits of abnormal proteins in neuroectodermic cells, and severe cell loss with atrophy of vulnerable cortical and subcortical structures (Mackenzie et al., 2006). The most common pathology in FTLD, accounting for 40%–65% of cases, has been found to be neuritis, neuronal cytoplasmic inclusions, and lenti-

* Corresponding author at: Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu9, 28040 Madrid, Spain. Tel: +34 91 837 3112; fax: +34 91 536 0432.

E-mail address: amrequero@cib.csic.es (Á. Martín-Requero).

form intranuclear inclusions, containing as the major component the TAR DNA binding protein 43 (TDP-43) (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006), and thus named FTLTDP (Mackenzie et al., 2010a). Four different patterns of TDP-43 pathology are recognized in FTLTDP, based on the anatomical distribution, morphology, and relative proportion of distinct types of inclusions (Mackenzie et al., 2010b). This heterogeneity is also supported by different clinical and genetic features. The FTLTDP includes the behavioral variant FTD (bv-FTD), PPA, and FTD with motor neuron disease (FTD-MND) (Bugiani, 2007). The next largest group of FTLTDP cases comprises FTLTDP with tau-positive pathology (FTLTDP-tau) (Kumar-Singh and Van Broeckhoven, 2007), and these patients can present atypical parkinsonism in addition to bv-FTD and PPA. Recently another small group of cases has been described to be immunoreactive for FUS in Sarcoma (FUS) (FTLTDP-FUS) mutations which have been associated with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009). The overlap between ALS and FTD, as well as the homology of FUS and TDP-43 prompted a number of studies that demonstrated that the inclusions of the several tau/TDP-43 negative FTLTDPs were immunoreactive for FUS (Munoz et al., 2009; Neumann et al., 2009), including the formerly designed FTLTDP-ubiquitin proteasome system (UPS) because the inclusions were detected with antibodies anti proteins of the ubiquitin proteasome system (UPS) (Mackenzie et al., 2010a).

Mutations in the progranulin gene (PGRN) have been identified as the major cause of FTLTDP (Baker et al., 2006; Cruts et al., 2006). All cases of PGRN mutations are recognized as the subtype 1 of FTLTDP (Mackenzie et al., 2010b), with most frequent presentations of bv-FTD and PPA (Mackenzie et al., 2010b). Up to now more than 60 different mutations in PGRN have been described associated with the etiology of the disease (www.molgen.ua.ac.be/FTDmutations/) (Gijssels et al., 2008). We have recently described a prevalent ancestral c.709-1G>A mutation related to Basque population (Lopez de Munain et al., 2008; Moreno et al., 2009). The c.709-1G>A mutation results in null allele, as most of the pathogenic mutation described up to now, suggesting that FTLTDP in these families results from PGRN haploinsufficiency (Baker et al., 2006).

The biological functions of PGRN in the central nervous system (CNS) have not been very well studied, and the mechanisms by which PGRN haploinsufficiency leads to neurodegeneration in FTLTDP remained speculative. PGRN is expressed in neurons and microglia (Ahmed et al., 2007). Some data suggest that PGRN may function as an autocrine neuronal growth factor. For instance, the addition of low concentrations of PGRN can promote mitogenesis in PC12 cells (Zhou et al., 1993). In addition, a possible role for PGRN in CNS inflammation has been proposed (Ahmed et al., 2007; Eriksen and Mackenzie, 2008). On these grounds, it seems plausible that neurodegeneration may result from

reduced neuronal growth support or protection (Mackenzie, 2007; Neumann et al., 2007).

Studies carried out during the last decade have highlighted the important role that cell cycle dysfunction may play in the instigation and progression of neurodegeneration (Wishart et al., 2006). Neuronal changes supporting alterations in cell cycle control in the etiology of neurodegenerative disorders include the ectopic expression of markers of the cell cycle, organelle kinesis, and DNA replication (Copani et al., 2001; Herrup et al., 2004; Zhu et al., 2004). Aberrant induction of cell cycle regulators in postmitotic neurons have been reported in several neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD), ALS, and Parkinson's disease (PD) (Arendt, 2003; Mosch et al., 2007; Yang et al., 2001). Little is known about the involvement of cell cycle-related events in the neurodegenerative process in FTLTDP. However, it was previously reported (Hussemann et al., 2000) the presence of mitotic markers in the frontal cortex of 2 individuals diagnosed FTLTDP-17 from the Seattle BK family carrying the ^{Val279Met} tau mutation. These authors also reported changes in cell cycle regulatory proteins in other FTLTDP-tau diseases such as corticobasal degeneration (CBD) or Pick disease (Hussemann et al., 2000).

A recent report has suggested a possible link between FTLTDP and altered cell cycle control (Ayala et al., 2008). Loss of functional nuclear TDP-43 as the consequence of accumulation of the protein in cytoplasm, leads to increased cyclin/CDK activity and retinoblastoma protein phosphorylation (pRb), which is a major determinant for G₁ progression (Weinberg, 1995).

The main goal of this work has been to study the influence of PGRN haploinsufficiency in cell cycle regulation of peripheral blood cells, which are easily accessible, from c.709-1G>A PGRN mutation carriers (PGRN+ cells). To this end, we have analyzed the proliferative activity of lymphoblasts from patients as well as from asymptomatic c.709-1G>A carriers and control subjects. Although FTLTDP symptoms reflect preferential neuronal loss in specific brain regions, PGRN is expressed in almost all tissues, so abnormalities outside the brain might be expected. In fact it is known that PGRN is highly expressed in peripheral blood cells (Coppola et al., 2008) and deficit of PGRN messenger ribonucleic acid (mRNA) and/or protein levels, had been detected in lymphocytes from PGRN mutation carriers (Coppola et al., 2008; Finch et al., 2009; Lopez de Munain et al., 2008). The lymphoblastoid cell lines, obtained by infecting peripheral blood mononuclear cells with the Epstein Barr virus (EBV), resemble activated B cells in the expression of activation markers and adhesion molecules (Wang et al., 1990). EBV-immortalized lymphocytes retain the cellular response of fresh obtained lymphocytes, to serum addition or withdrawal. We found similar changes in cell proliferation and survival, as well as in the content of certain regulatory proteins, in these cell lines than untransformed lymphocytes (Bartolome et al., 2007; Munoz et al.,

Table 1
Demographic characteristics of all subjects enrolled in the study

	Control n = 10	c.709-1 G>A carriers	
		Asymptomatic n = 12	FTLD patients n = 6
Age (years)	52 ± 4	53 ± 4	65 ± 3
Age range	(31–70)	(35–72)	(54–70)
Gender (male/female)	5/5	6/6	0/6

Control: individuals without sign of neurological degeneration. Values are expressed as mean ± standard error of the mean (SE).

Key: c.709-1G>A, progranulin mutation; FTLD, frontotemporal lobar degeneration.

2008), suggesting the usefulness of this experimental model particularly to study cell cycle-related events associated to neurodegeneration (de las Cuevas et al., 2003, 2005).

We report here a serum-mediated enhancement of proliferation of lymphoblasts from c.709-1G>A carriers, whether or not they have developed dementia. The increased cell proliferation is associated with increased pRb phosphorylation and cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) content. In addition, PGRN+ lymphoblasts show altered subcellular distribution of the TDP-43 protein. The decrease in nuclear TDP-43 in PGRN+ cells may provide an explanation for the increased levels of CDK6 and progression of these cultures through the cell cycle.

2. Methods

2.1. Cell lines

A total of 28 individuals were enrolled in this study: 18 carriers of the c.709-1G>A PGRN gene mutation, 6 of them patients of FTLD and 12 asymptomatic, and 10 control individuals without mutation in PGRN nor any sign of neurological degeneration. Asymptomatic and control individuals were relatives of patients. All patients were diagnosed as FTD in the Donostia Hospital by applying consensus criteria as published elsewhere (McKhann et al., 2001). Patients exhibited variable phenotype initial symptoms. Four of them presented the behavioral variant of frontotemporal dementia (bv-FTD), 1 progressive nonfluent aphasia, and corticobasal basal syndrome (CBS) the other. Patients developed a relatively rapidly progressive dementia with features that led to a secondary diagnosis. Notably, this secondary diagnosis was CBS in 3 of the bv-FTD cases. A summary of demographic characteristics of all subjects enrolled in this study is reported in Table 1.

The PGRN levels in plasma were strongly reduced in affected and unaffected subjects carrying the c.709-1G>A mutation (45 ± 15 ng/mL as compared with a mean value of 140 ng/mL for control individuals; Alzualde et al., unpublished results).

All study protocols were approved by the Donostia Hospital and the Spanish Council of Higher Research Institutional Review Board and are in accordance with National

and European Union Guidelines. In all cases, peripheral blood samples were taken after written informed consent of the patients or their relatives to determine the presence of the c.709-1G>A PGRN mutation and to establish the lymphoblastoid cell lines.

DNA was extracted from blood cells using standard procedures. PGRN gene sequencing procedures used at our laboratory have been published elsewhere (Lopez de Munain et al., 2008). For determination of progranulin plasma levels we used an ELISA kit (AdipoGene, Seoul, Korea).

Establishment of lymphoblastic cell lines was performed in our laboratory as previously described (Ibarreta et al., 1998) by infecting peripheral blood lymphocytes with the EBV (Koistinen, 1987). Cells were grown in suspension in T flasks in an upright position, in approximately 10 mL of RPMI-1640 (Invitrogen, Barcelona, Spain) medium that contained 2 mM L-glutamine, 100 mg/mL penicillin/streptomycin and, unless otherwise stated, 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and maintained in a humidified 5% CO₂ incubator at 37 °C. Fluid was routinely changed every 2 days by removing the medium above the settled cells and replacing it with an equal volume of fresh medium.

2.2. Determination of cell proliferation

Proliferation was determined by cell counting in a Neubauer chamber. EBV immortalized lymphocytes from control and PGRN mutation carriers were seeded at an initial cell concentration of 1×10^6 cells \times mL⁻¹. Cells were enumerated everyday thereafter. Potential toxicity of the reagents used was routinely checked by trypan blue exclusion under inverted phase-contrast microscopy.

2.3. Cell cycle analysis

Exponentially growing cultures of cell lines were seeded at an initial concentration of 1×10^6 cells \times mL⁻¹. Cell cycle analysis was performed using a standard method (Krishan, 1975). Cells were fixed in 75% ethanol for 1 hour at room temperature. Subsequent centrifugation of the samples was followed by incubation of cells in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 µg/mL of RNase at room temperature for 20 minutes and staining with propidium iodide (PI; 25 µg/mL). Cells were analyzed in an EPICS-XL cytofluorimeter (Coulter Científica, Móstoles, Spain). Estimates of cell cycle phase distributions were obtained by computer analysis of DNA content distributions.

2.4. Immunological analysis

2.4.1. Cell extracts

To prepare whole cell extracts, cells were harvested, washed in PBS and then lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1% Nonidet P-40), containing 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM sodium pyrophosphate and protease inhibitor Complete Mini Mixture (Roche, Mannheim, Germany).

Cytosolic and nuclear proteins were differentially extracted by lysing cells in ice-cold hypotonic buffer (10 mM Hepes, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.1 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 1 mM dithiothreitol (DTT)) containing 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 1 mM sodium pyrophosphate, and protease inhibitor mixture. After extraction on ice for 15 minutes, 0.5% Nonidet P-40 was added, and the lysed cells centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes. Supernatants containing cytosolic proteins were centrifuged at 13,000 rpm for 10 minutes. Nuclei were washed twice with the hypotonic buffer, and then lysed in hypertonic buffer (20 mM Hepes, pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT) containing 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 1 mM sodium pyrophosphate and protease inhibitor mixture. After extraction on ice for 30 minutes, the samples were centrifuged at 15,000 rpm for 15 minutes at 4 °C. Antibodies to β -tubulin and to lamin B1 were used to assess the purity of the fractions.

The protein content of the extracts was determined by the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA).

2.5. Western blot analysis

Fifty to 100 μ g of protein from cell extracts were fractionated on an sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel, and transferred to PVDF membrane (Immobilon-P, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). The amount of protein and the integrity of transfer were verified by staining with Ponceau-S solution (Sigma, Tres Cantos, Madrid, Spain). The membranes were then blocked with nonfat milk and incubated, overnight at 4 °C, with primary antibodies at the following dilutions: 1:500 anti-pRb, 1:500 anti-CDK2, 1:500 anti-CDK4, 1:200 anti-CDK6, 1:500 anti cyclin E, 1:1000 anti cyclin D1, 1:100 anti-cyclin D2, 1:2000 anti-cyclin D3, 1:500 anti-p27, 1:500 anti-p21, 1:500 anti-p16, 1:200 anti-p18, 1:500 anti-TDP-43, 1:2000 β -actin, and 1:1000 anti-lamin β 1. Signals from the primary antibodies were amplified using species-specific antisera conjugated with horseradish peroxidase (Sigma) and detected with a chemiluminiscent substrate detection system ELC (Amersham, Alcobendas, Madrid, Spain). The relative protein levels were determined by scanning the bands with a GS-800 imaging densitometer provided with the Quantity One 4.3.1 software from Bio-Rad.

2.6. Confocal laser scanning microscopy

Immortalized lymphocytes from control and c.709-1G>A carrier individuals were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{mL}^{-1}$ and incubated in RPMI medium containing 10% FBS for 48 hours.

Cells were fixed for 15 minutes in 4% paraformaldehyde in PBS, and blocked and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS-0.5% bovine serum albumin (BSA) for 20 minutes at room temperature. Then, cells were incubated with anti-TDP-43 polyclonal antibody (Protein Tech Group, Chicago, IL, USA). After washing with PBS, cells were incubated with

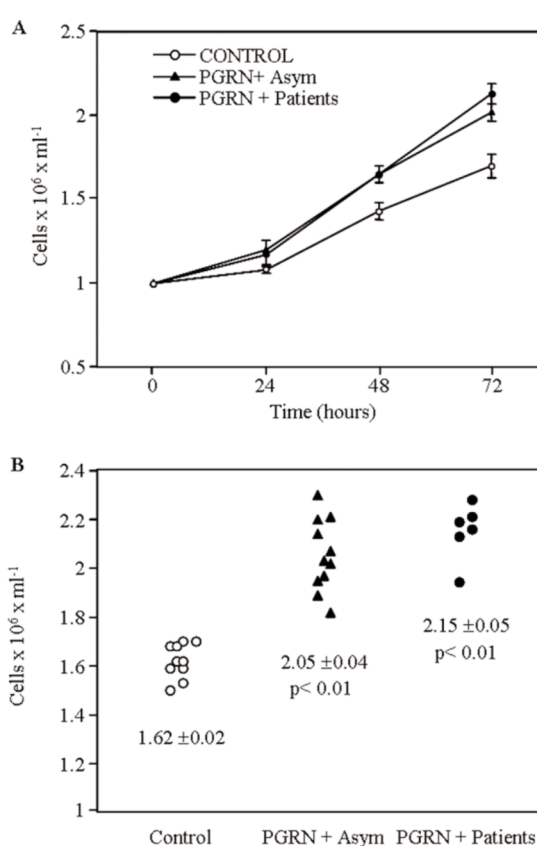


Fig 1. Proliferation of lymphoblasts from control subjects and progranulin gene (PGRN) mutation c.709-1G>A carriers. (A) Immortalized lymphoblasts from control (open circles), PGRN mutation carriers asymptomatic (filled triangles), and carriers affected with frontotemporal lobar degeneration (FTLD) (filled circles) were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ and cultured for 3 days in RPMI (Invitrogen) medium containing 10% fetal bovine serum (FBS). Everyday thereafter, samples were taken for cell counting. Values shown are the mean \pm standard error of the mean (SE). (B) Scatter plots comparing proliferative activity between control and PGRN+ lymphoblasts after 72 hours of serum stimulation.

Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit antibody. When indicated, Alexa Fluor 568 conjugated to phalloidin was added to simultaneously visualize F-actin. For nuclear staining, samples were incubated with DAPI (Sigma) at 4 mg/mL in PBS for 15 minutes at room temperature. The preparations were mounted on FluorSave reagent (Calbiochem, Madrid, Spain) and visualized with the Leica TCS-SP2-AOBS confocal microscope system (Heidelberg, Germany).

2.7. Statistical analysis

Unless otherwise stated, all data represent means \pm standard error of the mean (SE). Statistical analysis was performed on the Data Desk package (version 4.0) for Macintosh (Data Description Inc, Ithaca, NY, USA). Statistical significance was

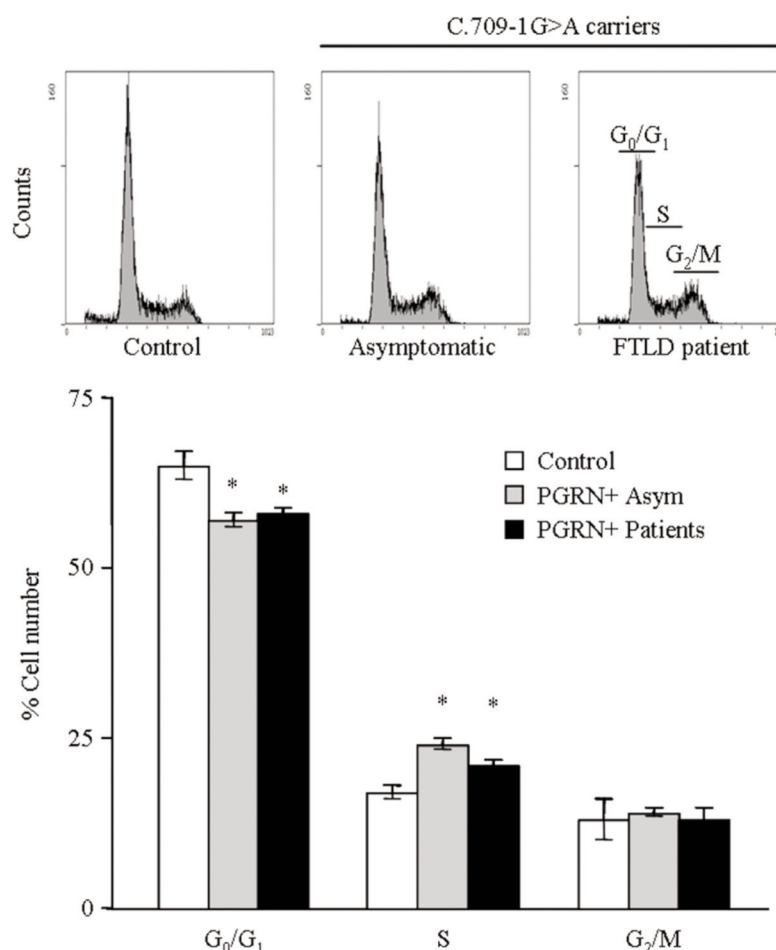


Fig 2. Cell cycle distribution of lymphoblasts in control subjects and progranulin gene (PGRN) mutation c.709-1G>A carriers. The experimental conditions are identical to those described in the legend to Fig. 1. After 36 hours of serum stimulation, cells were harvested, fixed, and analyzed by flow cytometry as described in Methods. Labels show areas of curve corresponding to G₀/G₁, S, and G₂/M phases of cell cycle. The percentages of cells in the different phases of cell cycle are summarized below. Data shown are the mean \pm standard error of the mean (SE) of different experiments carried out with cell lines from 6 control subjects, asymptomatic, or frontotemporal lobar degeneration (FTLD) patients, carrying the PGRN c.709-1G>A mutation, respectively. * $p < 0.05$ significantly different from control cells.

estimated by the Student *t* test or, when appropriate, by analysis of variance (ANOVA) followed by the Fischer's least significant difference (LSD) test for multiple comparisons. Differences were considered significant at a level of $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Proliferative activity of lymphoblasts from control and PGRN+ individuals

Fig. 1A shows a time course analysis of the proliferative activity of lymphoblasts from control and c.709-1G>A carriers, both asymptomatic and FTLD affected cases. For these experiments, cells were seeded at an initial density of

1×10^6 cells \times mL⁻¹ in the presence of 10% FBS and counted for 3 days thereafter. Cell counts of c.709-1G>A carriers were significantly higher than those from normal individuals the first day after seeding ($p < 0.05$), and the increased rate was maintained along 3 days of experiment. No differences were observed between cells from asymptomatic or patients. Fig. 1B depicts a scatter plot of the proliferative activity of the lymphoblastoid cell lines used in this study 72 hours after serum stimulation.

Cell cycle disturbances in neurodegenerative disorders appear to involve a G₁/S checkpoint failure (Nagy, 2007). For this reason, we find it interesting to determine the cell cycle status of lymphoblasts from control or c.709-1G>A

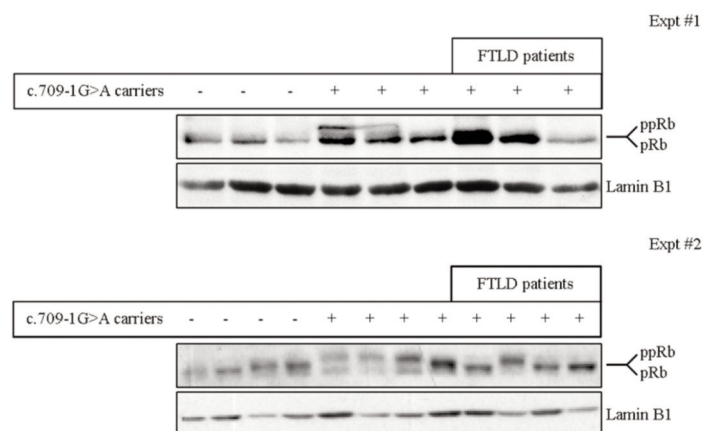


Fig 3. Influence of the progranulin gene (PGRN) mutation C.709-1G>A on retinoblastoma protein (pRb) levels and phosphorylation status. Immortalized lymphoblasts from control and PGRN mutation carriers, either asymptomatic or frontotemporal lobar degeneration (FTLD) patients, were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ and cultured in RPMI (Invitrogen) medium containing 10% fetal bovine serum (FBS). After 2 days of culture, cells were harvested and pRb was detected by immunoblotting using a phospho-specific anti-pRb antibody. Two different experiments are shown. pp = the hyperphosphorylated form of the Rb protein.

carriers, either asymptomatic or FTLD patients, after 36 hours of serum stimulation. As shown in Fig. 2, the proportion of cells in G₁ phase was significantly lower and the proportion of cells in S phase was significantly higher in PGRN+ cells than those in control cells, 36 hours after of serum stimulation. Again, no differences in cell cycle distribution were found between lymphoblasts from asymptomatic or FTLD patients (Fig. 2). On the other hand we did not observe significant changes in the proportion of sub-G₀/G₁ hypodiploid cells, characteristic of apoptosis/necrosis among the groups (Fig. 2), suggesting that the increased cell number in cultures of c.709-1G>A carriers, truly reflects an increase in cell proliferation.

3.2. Expression of key cell cycle regulatory proteins in control and PGRN+ lymphoblasts

Passage through the restriction point in late G₁ and commitment to DNA synthesis are controlled by the presence and phosphorylation status of pRb (Draetta, 1994; Weinberg, 1995). Hypo- and hyperphosphorylated forms of this protein are easily distinguished in SDS-polyacrylamide gels. Fig. 3 shows the phosphorylation status of pRb in control and PGRN+ lymphoblasts 48 hours after serum stimulation. It is observed an increase in pRb phosphorylation in PGRN+ cells, as evidenced by the higher intensity of the slower migrating band (Fig. 3).

The phosphorylation of pRb is mediated by the cyclin-dependent kinases CDK4/CDK6-cyclin D1 and CDK2-cyclin E (Lundberg and Weinberg, 1998; Mittnacht, 1998). As shown in Fig. 4 no differences were observed in the protein levels of cyclins E, D2, and D3 between control or PGRN+ cells. The levels of cyclin D1 were barely detectable in these cell cultures (Fig. 4). Fig. 5 shows the cellular content of

CDKs. While CDK2 and CDK4 levels were similar in control and PGRN+ lymphoblasts, we detected a significant increase in CDK6 was found in both PGRN+ cells from asymptomatic or FTLD patients (Fig. 5). We then analyzed the cellular content of the members of Cip/Kip or the INK4 family of CDKs inhibitors in control and PGRN+ cells. Results are summarized in Fig. 6. We did not observe differences on either p21 or p27 content between control and PGRN+ cells. Neither did we find differences on the INK members, p16 and p18 (Fig. 6). Taken together, these observations suggest that the increased pRb phosphorylation in PGRN+ lymphoblasts may depend on CDK6 activity.

To further analyze the involvement of CDK6 activity on the enhanced proliferation of lymphoblasts bearing the c.709-1G>A PGRN mutation, use was made of the CDK6 inhibitor sodium butyrate (Kim et al., 2007). As shown in Fig. 7A, treatment of PGRN+ lymphoblasts with increasing concentrations of sodium butyrate resulted in a significant inhibition of cell proliferation in a dose-dependent manner. Sodium butyrate did not change the proliferation of lymphoblasts from control individuals. We next evaluated the effect of 10 μM sodium butyrate on the cellular levels of CDK6. As shown in Fig. 7B, treatment of PGRN+ cells with sodium butyrate decreased the content of the CDK6 protein to levels similar to those of control cells. As expected, sodium butyrate was able to decrease the phosphorylation status of pRb in lymphoblasts from PGRN+ subjects (Fig. 7B).

3.3. Subcellular distribution of TDP-43

It has been recently reported that TDP-43, the main protein in the ubiquitin+ inclusions in FTLD brains, negatively regulates the expression of CDK6 (Ayala et

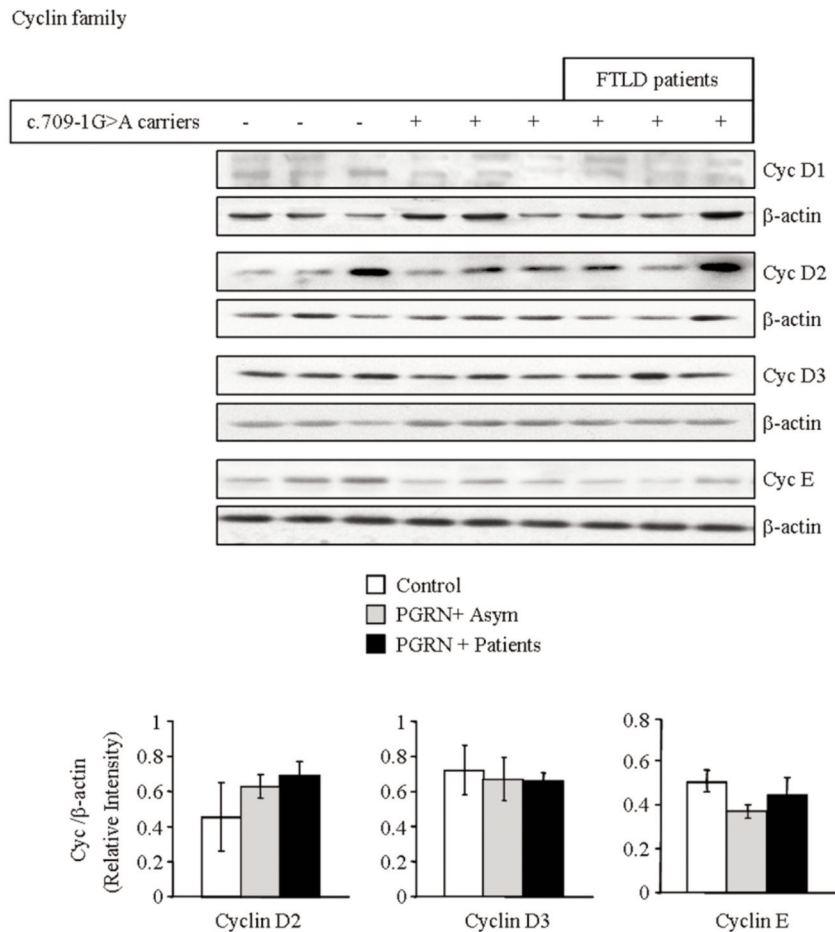


Fig 4. Cellular content of the Cyclin family of proteins involved in G_1 regulation in serum-stimulate lymphoblasts from control or progranulin gene (PGRN) mutation carriers. Cells were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{mL}^{-1}$. Two days after stimulation with 10% fetal bovine serum (FBS), samples were taken from each culture and total cellular proteins were separated on denaturing gels and immunoblotted with the appropriate antibody as shown in the figure. Immunoreactive proteins were visualized with the enhanced chemiluminescence detection system. The densitometric data represent the mean \pm standard error of the mean (SE) for of at least 6 independent experiments carried out in cell lines derived from different individuals.

al., 2008). On these grounds, we considered the possibility of a loss of function of TDP-43 secondary to changes in the nuclear content of this protein. For this reason, we studied whether there are changes in the subcellular distribution of TDP-43 in PGRN+ cells. To this end control and PGRN+ lymphoblasts were processed for immunostaining and confocal laser scanning microscopy or fractionated to enrich for nuclear or cytoplasmatic proteins. In agreement with a previous report (Buratti and Baralle, 2009), TDP-43 predominantly localizes in the nucleus (Fig. 8A), although low levels of TDP-43 are observed in the cytosol. The Western blot analysis of nuclear and cytoplasmic proteins revealed in PGRN+ cells, a small, but statistically significant, increase in the cytosolic con-

tent of TDP-43 that paralleled the decrease in nuclear levels of TDP-43 (Fig. 8B).

4. Discussion

Accumulating evidence suggests that activation of cell cycle machinery contributes to neuronal dysfunction, and eventual neurodegeneration (Wishart et al., 2006). A cohort of neurodegenerative conditions that present cell cycle alterations have been identified. These include Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), ALS and others (Appert-Collin et al., 2006; Hoglinger et al., 2007). So far, cell cycle disturbances associated with FTLT have been reported for a number of FTLT-tau cases, including carriers

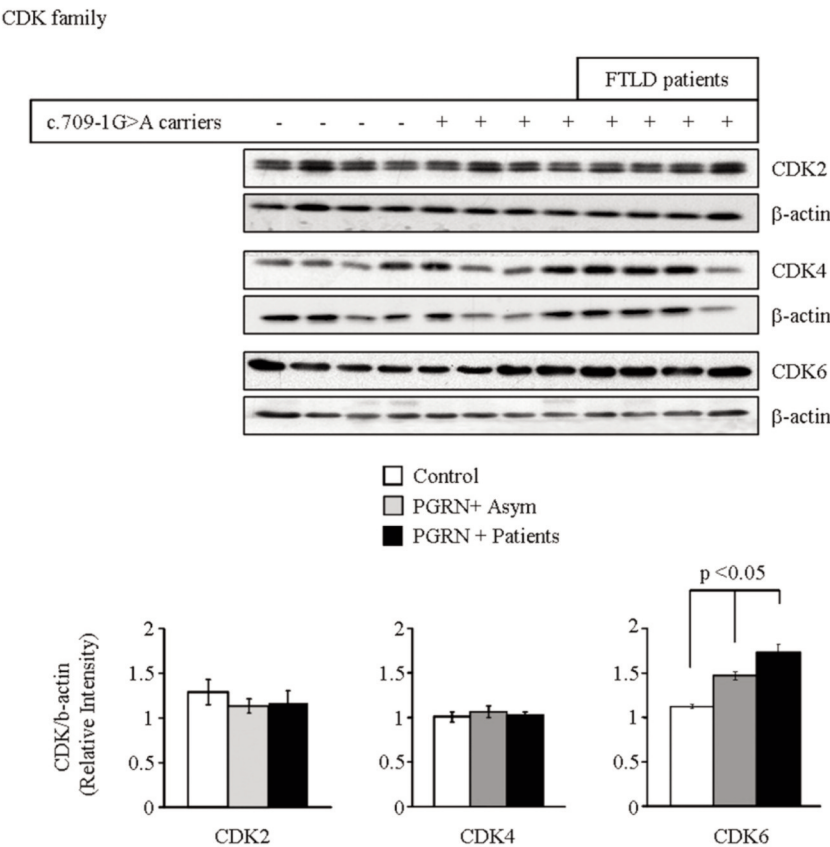


Fig 5. Cellular content of the cyclin-dependent kinase (CDK) family of proteins involved in G_1 regulation in serum-stimulate lymphoblasts from control or progranulin gene (PGRN) mutation carriers. The experimental conditions were identical to those for Fig. 4. Representative immunoblots are shown, while below the densitometric analyses are presented. Data shown represent the mean \pm standard error of the mean (SE) for at least 6 different experiments carried out in cell lines derived from different individuals.

of tau mutations or patients bearing tau inclusions (Hussein et al., 2000). Because these disorders are triggered by different etiologic factors, it is suggested that cell cycle activation may be the cellular response to different insults, and alterations of cell cycle regulatory proteins could be a convergent mechanism to neurodegeneration. Previous work from our and other laboratories (Bartolome et al., 2007; de las Cuevas et al., 2003, 2005; Munoz et al., 2008; Nagy et al., 2002; Zhou and Jia, 2010) had demonstrated that cell cycle-related events can be detected outside the CNS, i.e., in peripheral blood lymphocytes, suggesting, therefore, that these easily accessible cells may represent useful tools to study the mechanisms involved in the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

In this study, we have examined the cellular response to serum stimulation of lymphoblasts derived from control and individuals carrying the c.709-1G>A PGRN mutation, either asymptomatic or diagnosed of FTL. For this purpose, a comparative study on cell proliferation, cell cycle profiles,

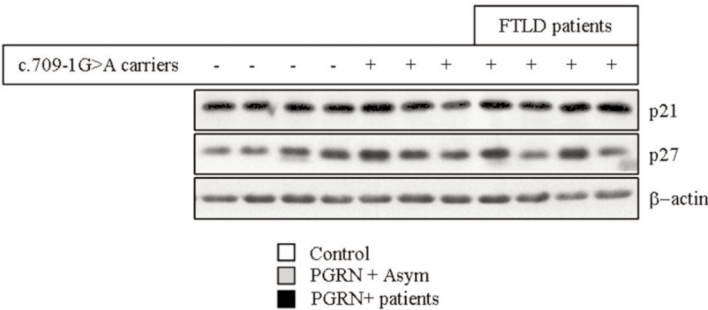
and expression levels of key cell cycle regulatory proteins was performed. In addition, we investigated potential differences in the subcellular distribution of TDP-43 in control or PGRN+ lymphoblasts.

Lymphoblasts from PGRN+ subjects show cell cycle progress modifications such as a decrease of cells in G_1 , an increased number of cells in S, together with altered expression and phosphorylation of pRb and other proteins involved in cell cycle regulation. pRb protein functions as a molecular interface coupling the extracellular signals to the transcriptional machinery of the cells (Hatakeyama and Weinberg, 1995). When it is hypophosphorylated, pRb forms inhibitory complexes with members of E2F family of transcription factors (Chellappan et al., 1991). Upon phosphorylation, pRb releases E2F, allowing them to promote the transcription of gene products necessary for cell cycle progression (Helin, 1998).

pRb is sequentially phosphorylated by 2 sets of protein kinases, the cyclin D/CDK4/CDK6 and cyclin E/CDK2

CDK inhibitors

A: KIP1/CIP1



B: INK4

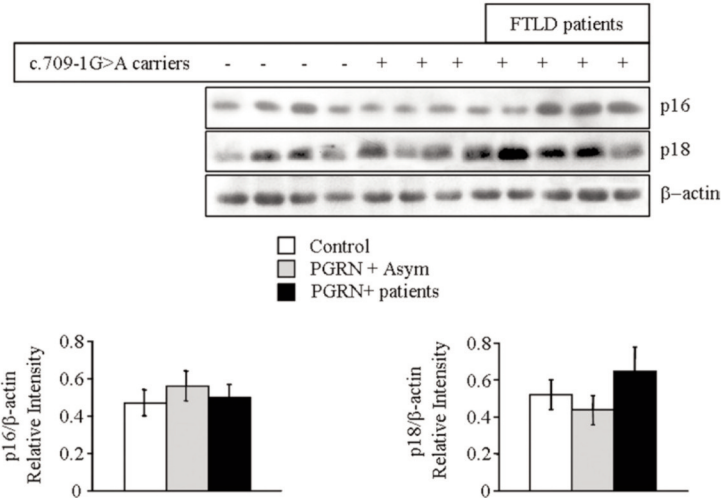


Fig 6. Cellular content of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors involved in G₁ regulation in serum-stimulate lymphoblasts from control or progranulin gene (PGRN) mutation carriers. The levels of the CDK inhibitors either the Cip1/Kip1 or the INK families were determined after 2 days of serum stimulation. Representative immunoblots are presented. The densitometric data represent the mean ± standard error of the mean (SE) for of at least 6 independent experiments carried out in cell lines derived from different individuals.

complexes (Mittnacht, 1998). We did not observe differences in the levels of expression of cyclins D and E or in the kinases CDK4 and CDK2 between control and PGRN+ cells. However, a significant increase in cellular content in CDK6 protein was observed in PGRN+ lymphoblasts from FTLD patients. The cellular content of CDK inhibitors, either of the Cip/Kip family or the INK4 family was not

influenced by PGRN deficiency. Therefore, the observed increase in the amount of hyperphosphorylated pRb in PGRN+ lymphoblasts seems to be the result of enhanced CDK6 activity.

The activity and expression of CDK6 is amplified in a number of tumors (Brito-Babapulle et al., 2002; Timmermann et al., 1997). Recently, it has been reported that CDK6

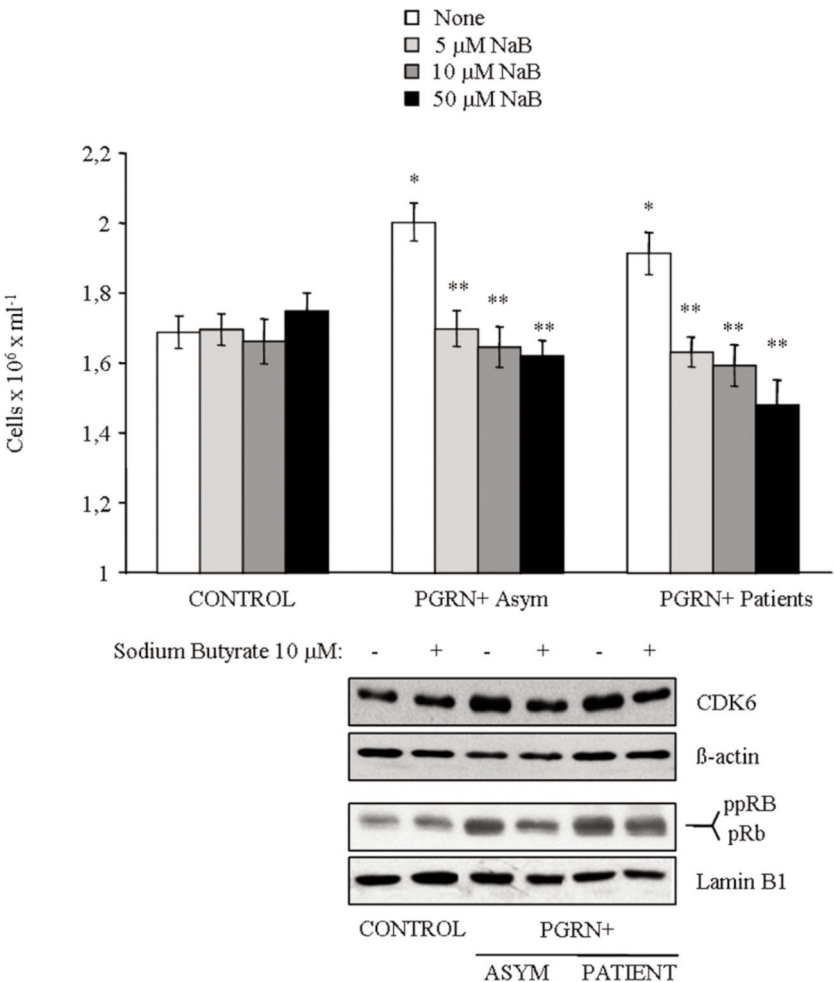


Fig 7. Effect of increasing concentrations of sodium butyrate on proliferation of lymphoblasts from control and carriers of the c.709-1G>A progranulin gene (PGRN) mutation. (A) Lymphoblasts from control and PGRN+ individuals were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{mL}^{-1}$ in RPMI (Invitrogen) medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), in the presence of increasing concentrations of sodium butyrate and cultured for 3 days. Values shown are the mean \pm standard error of the mean (SE) for, at least, 6 independent experiments carried out with different individuals. * $p < 0.01$ significantly different from control cells; ** $p < 0.01$ significantly different from PGRN+ lymphoblasts in the absence of sodium butyrate. (B) The effects of 10 μM sodium butyrate on cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) content and retinoblastoma protein phosphorylation (pRb) status in control and PGRN+ lymphoblasts were evaluated 48 hours after the addition of sodium butyrate. Five independent experiments were performed obtaining similar results. The mean values for CDK6/ β -actin ratios were 0.55 ± 0.01 , 0.81 ± 0.09 , and 0.84 ± 0.07 in the absence of sodium butyrate and 0.53 ± 0.1 , 0.53 ± 0.06 , and 0.53 ± 0.08 in the presence of sodium butyrate for control, asymptomatic PGRN+, and patients respectively. Differences found in PGRN+ cells incubated in the presence of sodium butyrate were statistically significant ($p < 0.05$). Representative immunoblots are shown. pp: hyperphosphorylated form of pRb.

is repressed by TDP-43 (Ayala et al., 2008). The control of CDK6 expression mediated by TDP-43 involves GT repeats in the target gene sequence. The repeat traces are present once or twice in all of the larger introns. In contrast, introns in other human CDK genes, e.g., CDK4 and CDK2, are significantly shorter and lack GT repeats (GT)_n (Ayala et al., 2008). Although these studies were performed in non-neuronal cells, increased CDK activity and pRb phosphorylation have been linked to neuronal death in a number of

cell and animal models of neurodegeneration (Greene et al., 2007; Nguyen et al., 2002). Recent studies have indicated that PGRN deficiency may result in a caspase-mediated cleavage of TDP-43 leading to mislocalization of TDP-43 to insoluble cytosolic fraction (Dormann et al., 2009; Zhang et al., 2007). Our results indicate that PGRN+ cells display a small but significant decrease in the nuclear content of TDP-43. Taken together, these observations suggest that a loss of nuclear TDP-43 function in repressing CDK6, may

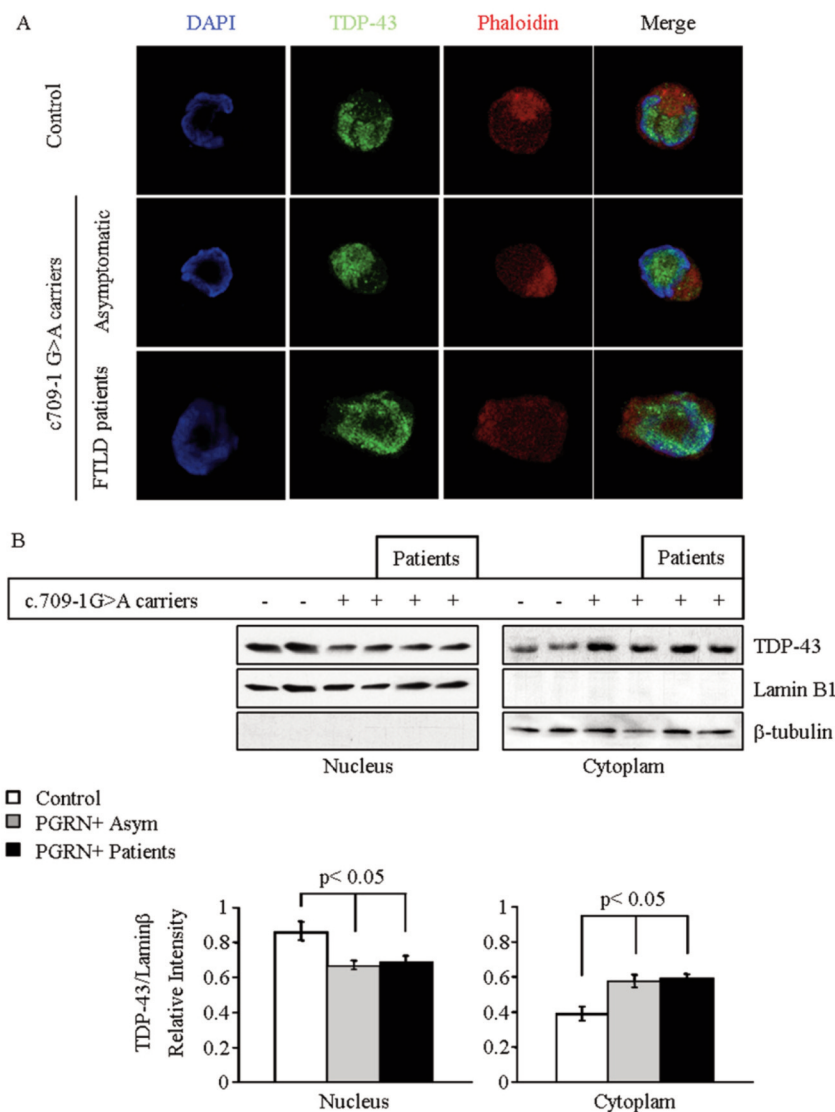


Fig 8. Influence of the progranulin gene (PGRN) mutation c.709-1G>A on the subcellular localization of TDP-43 protein. (A) Lymphoblasts from control and PGRN+ individuals were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{mL}^{-1}$ and incubated during 48 hours in RPMI (Invitrogen) medium containing 10% fetal bovine serum (FBS). TDP-43 protein localization was assessed by confocal laser scanning microscopy. Cells were stained with anti-TDP-43 antibody followed by secondary antibody labeled with Alexa Fluor 488. DAPI and phalloidin were used for nuclear or cytosolic staining respectively. Merged images depict a predominant nuclear localization for TDP-43 protein. Magnification (63 \times). (B) Cells were harvested after 48 hours of serum stimulation and fractionated to determine by immunoblot the localization of TDP-43. Antibodies to β -tubulin and to lamine B1 were used as control of purity and loading of cytoplasmic and nuclear protein extracts, respectively. Representative immunoblots are shown, whereas the densitometric analysis is presented below. Data represent mean \pm standard error of the mean (SE) for at least 6 experiments. * $p < 0.05$ significantly different from control lymphoblasts.

be involved in the increased pRb phosphorylation, and enhanced proliferative activity of PGRN+ cells.

Our results show no differences in the proliferative activity and cellular content of CDK6 among lymphoblasts derived from FTLD patients presenting different clinical presentation (bv-FTD, PPA, or CBS). Moreover, we had not

observed significant differences between c.709-1G>A mutation carriers whether asymptomatic or with clinical signs of dementia. Because most of the asymptomatic carriers are younger than the patients (Table 1), this finding suggests that cell cycle disturbances may be early manifestations of the disease. However, we observed that some PGRN+

individuals remain asymptomatic until advanced age. For example, only 1 of 4 brothers (age 63–71), carriers of c.709-1G>A mutation was diagnosed with FTLT. This observation indicates the existence of modifier factors (either genetic or environmental) in determining the onset of clinical disease.

In summary, our results established a molecular link between mislocalization of TDP-43 and increased CDK6 levels, pRb phosphorylation, and proliferation of lymphoblasts from c.709-1G>A carriers. Assuming that the cell cycle disturbances reported here could be peripheral signs of the disease, our results suggest that neurons of c.709-1G>A mutation carriers are at high risk of entering an unscheduled cell cycle that would then drive them to death. It is suggested that therapeutic interventions aimed at ameliorating cell cycle progression activity may have a positive impact in FTLT.

Disclosure statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

All study protocols were approved by the Donostia Hospital and the Spanish Council of Higher Research Institutional Review Board and are in accordance with National and European Union Guidelines. In all cases, peripheral blood samples were taken after written informed consent of the patients or their relatives.

Acknowledgements

This work has been supported by grants from Ministry of Education and science (SAF2007-62405, SAF2010-15700), Fundación Eugenio Rodríguez Pascual, Diputación Foral de Gipuzkoa (76/08) and Basque Government (Saiotek program). N.E. holds a fellowship of the JAE predoctoral program of the CSIC. J.J. Merino holds a contract of the Ramon y Cajal Program of the Spanish Ministry of Science and Innovation.

References

- Ahmed, Z., Mackenzie, I.R., Hutton, M.L., Dickson, D.W., 2007. Progranulin in frontotemporal lobar degeneration and neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* 4, 7.
- Appert-Collin, A., Hugel, B., Levy, R., Niederhoffer, N., Coupin, G., Lombard, Y., Andre, P., Poindron, P., Gies, J.P., 2006. Cyclin dependent kinase inhibitors prevent apoptosis of postmitotic mouse motoneurons. *Life Sci.* 79, 484–490.
- Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., Hashizume, Y., Oda, T., 2006. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 602–611.
- Arendt, T., 2003. Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the “Dr Jekyll and Mr Hyde concept” of Alzheimer’s disease or the yin and yang of neuroplasticity. *Prog. Neurobiol.* 71, 83–248.
- Ayala, Y.M., Misteli, T., Baralle, F.E., 2008. TDP-43 regulates retinoblastoma protein phosphorylation through the repression of cyclin-dependent kinase 6 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3785–3789.
- Baker, M., Mackenzie, I.R., Pickering-Brown, S.M., Gass, J., Rademakers, R., Lindholm, C., Snowden, J., Adamson, J., Sadovnick, A.D., Rollinson, S., Cannon, A., Dwosh, E., Neary, D., Melquist, S., Richardson, A., Dickson, D., Berger, Z., Eriksen, J., Robinson, T., Zehr, C., Dickey, C.A., Crook, R., McGowan, E., Mann, D., Boeve, B., Feldman, H., Hutton, M., 2006. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 442, 916–919.
- Bartolome, F., de las Cuevas, N., Munoz, U., Bermejo, F., Martin-Requero, A., 2007. Impaired apoptosis in lymphoblasts from Alzheimer’s disease patients: cross-talk of Ca²⁺/calmodulin and ERK1/2 signaling pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1437–1448.
- Brito-Babapulle, V., Gruszka-Westwood, A.M., Platt, G., Andersen, C.L., Elnenaei, M.O., Matutes, E., Wotherspoon, A.C., Weston-Smith, S.G., Catovsky, D., 2002. Translocation t(2;7) (p12; q21-22) with dysregulation of the CDK6 gene mapping to 7q21-22 in a non-Hodgkin’s lymphoma with leukemia. *Haematologica* 87, 357–362.
- Bugiani, O., 2007. The many ways to frontotemporal degeneration and beyond. *Neurol. Sci.* 28, 241–244.
- Buratti, E., Baralle, F.E., 2009. The molecular links between TDP-43 dysfunction and neurodegeneration. *Adv. Genet.* 66, 1–34.
- Chellappan, S.P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J.M., Nevins, J.R., 1991. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 65, 1053–1061.
- Copani, A., Uberti, D., Sortino, M.A., Bruno, V., Nicoletti, F., Memo, M., 2001. Activation of cell-cycle-associated proteins in neuronal death: a mandatory or dispensable path? *Trends Neurosci.* 24, 25–31.
- Coppola, G., Karydas, A., Rademakers, R., Wang, Q., Baker, M., Hutton, M., Miller, B.L., Geschwind, D.H., 2008. Gene expression study on peripheral blood identifies progranulin mutations. *Ann. Neurol.* 64, 92–96.
- Cruts, M., Gijssels, I., van der Zee, J., Engelborghs, S., Wils, H., Pirici, D., Rademakers, R., Vandenbergh, R., Dermaut, B., Martin, J.J., van Duijn, C., Peeters, K., Sciot, R., Santens, P., De Pooter, T., Mattheijssens, M., Van den Broeck, M., Cuij, I., Vennekens, K., De Deyn, P.P., Kumar-Singh, S., Van Broeckhoven, C., 2006. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* 442, 920–924.
- de las Cuevas, N., Munoz, U., Hermida, O.G., Martin-Requero, A., 2005. Altered transcriptional regulators in response to serum in immortalized lymphocytes from Alzheimer’s disease patients. *Neurobiol. Aging* 26, 615–624.
- de las Cuevas, N., Urcelay, E., Hermida, O.G., Saiz-Diaz, R.A., Bermejo, F., Ayuso, M.S., Martin-Requero, A., 2003. Ca²⁺/calmodulin-dependent modulation of cell cycle elements pRb and p27kip1 involved in the enhanced proliferation of lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia. *Neurobiol. Dis.* 13, 254–263.
- Dormann, D., Capell, A., Carlson, A.M., Shankaran, S.S., Rodde, R., Neumann, M., Kremmer, E., Matsuwaki, T., Yamanouchi, K., Nishihara, M., Haass, C., 2009. Proteolytic processing of TAR DNA binding protein-43 by caspases produces C-terminal fragments with disease defining properties independent of progranulin. *J. Neurochem.* 110, 1082–1094.
- Draetta, G.F., 1994. Mammalian G1 cyclins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 842–846.
- Eriksen, J.L., Mackenzie, I.R., 2008. Progranulin: normal function and role in neurodegeneration. *J. Neurochem.* 104, 287–297.
- Finch, N., Baker, M., Crook, R., Swanson, K., Kuntz, K., Surtees, R., Bisceglia, G., Rovelet-Lecrux, A., Boeve, B., Petersen, R.C., Dickson, D.W., Younkin, S.G., Deramecourt, V., Crook, J., Graff-Radford, N.R., Rademakers, R., 2009. Plasma progranulin levels predict progranulin mutation status in frontotemporal dementia patients and asymptomatic family members. *Brain* 132, 583–591.

- Gijssels, I., Van Broeckhoven, C., Cruts, M., 2008. Granulin mutations associated with frontotemporal lobar degeneration and related disorders: an update. *Hum. Mutat.* 29, 1373–1386.
- Greene, L.A., Liu, D.X., Troy, C.M., Biswas, S.C., 2007. Cell cycle molecules define a pathway required for neuron death in development and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 392–401.
- Hatakeyama, M., Weinberg, R.A., 1995. The role of RB in cell cycle control. *Prog. Cell Cycle Res.* 1, 9–19.
- Helin, K., 1998. Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 28–35.
- Herrup, K., Neve, R., Ackerman, S.L., Copani, A., 2004. Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death. *J. Neurosci.* 24, 9232–9239.
- Hoglinger, G.U., Breunig, J.J., Depboylu, C., Rouaux, C., Michel, P.P., Alvarez-Fischer, D., Bouillier, A.L., Degregori, J., Oertel, W.H., Ratic, P., Hirsch, E.C., Hunot, S., 2007. The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3585–3590.
- Husman, J.W., Nochlin, D., Vincent, I., 2000. Mitotic activation: a convergent mechanism for a cohort of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* 21, 815–828.
- Ibarreta, D., Urcelay, E., Parrilla, R., Ayuso, M.S., 1998. Distinct pH homeostatic features in lymphoblasts from Alzheimer's disease patients. *Ann. Neurol.* 44, 216–222.
- Ikeda, M., Ishikawa, T., Tanabe, H., 2004. Epidemiology of frontotemporal lobar degeneration. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 17, 265–268.
- Kim, J., Park, H., Im, J.Y., Choi, W.S., Kim, H.S., 2007. Sodium butyrate regulates androgen receptor expression and cell cycle arrest in human prostate cancer cells. *Anticancer Res.* 27, 3285–3292.
- Koistinen, P., 1987. Human peripheral blood and bone marrow cell separation using density gradient centrifugation on Lymphoprep and Percoll in haematological diseases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 47, 709–714.
- Krishan, A., 1975. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell Biol.* 66, 188–193.
- Kumar-Singh, S., Van Broeckhoven, C., 2007. Frontotemporal lobar degeneration: current concepts in the light of recent advances. *Brain Pathol.* 17, 104–114.
- Kwiatkowski, T.J., Jr, Bosco, D.A., Leclerc, A.L., Tamrazian, E., Vandenburg, C.R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T., Valdmann, P., Rouleau, G.A., Hosler, B.A., Cortelli, P., de Jong, P.J., Yoshinaga, Y., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Yan, J., Ticozzi, N., Siddique, T., McKenna-Yasek, D., Sapp, P.C., Horvitz, H.R., Landers, J.E., Brown, R.H., Jr, 2009. Mutations in the FUS/ALS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323, 1205–1208.
- Lopez de Munain, A., Alzualde, A., Gorostidi, A., Otaegui, D., Ruiz-Martinez, J., Indakotxea, B., Ferrer, I., Perez-Tur, J., Saenz, A., Bergareche, A., Barandiaran, M., Poza, J.J., Zabalza, R., Ruiz, I., Urtaun, M., Fernandez-Manchola, I., Olasagasti, B., Espinal, J.B., Olaskoaga, J., Ruibal, M., Moreno, F., Carrera, N., Masso, J.F., 2008. Mutations in progranulin gene: clinical, pathological, and ribonucleic acid expression findings. *Biol. Psychiatry* 63, 946–952.
- Lundberg, A.S., Weinberg, R.A., 1998. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol. Cell Biol.* 18, 753–761.
- Mackenzie, I.R., 2007. The neuropathology and clinical phenotype of FTD with progranulin mutations. *Acta Neuropathol.* 114, 49–54.
- Mackenzie, I.R., Rademakers, R., Neumann, M., 2010a. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol.* 9, 995–1007.
- Mackenzie, I.R., Shi, J., Shaw, C.L., Duplessis, D., Neary, D., Snowden, J.S., Mann, D.M., 2006. Dementia lacking distinctive histology (DLDH) revisited. *Acta Neuropathol.* 112, 551–559.
- Mackenzie, I.R., Neumann, M., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Alafuzoff, I., Kril, J., Kovacs, G.G., Ghetti, B., Halliday, G., Holm, I.E., Ince, P.G., Kamphorst, W., Revesz, T., Rozemuller, A.J., Kumar-Singh, S., Akiyama, H., Baborie, A., Spina, S., Dickson, D.W., Trojanowski, J.Q., Mann, D.M., 2010b. Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta Neuropathol.* 119, 1–4.
- McKhann, G.M., Albert, M.S., Grossman, M., Miller, B., Dickson, D., Trojanowski, J.Q., 2001. Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Arch. Neurol.* 58, 1803–1809.
- Mittnacht, S., 1998. Control of pRb phosphorylation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 21–27.
- Moreno, F., Indakotxea, B., Barandiaran, M., Alzualde, A., Gabilondo, A., Estanga, A., Ruiz, J., Ruibal, M., Bergareche, A., Marti-Masso, J.F., Lopez de Munain, A., 2009. "Frontotemporoparietal" dementia: clinical phenotype associated with the c.709-1G>A PGRN mutation. *Neurology* 73, 1367–1374.
- Mosch, B., Morawski, M., Mittag, A., Lenz, D., Tarnok, A., Arendt, T., 2007. Aneuploidy and DNA replication in the normal human brain and Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 27, 6859–6867.
- Munoz, D.G., Neumann, M., Kusaka, H., Yokota, O., Ishihara, K., Terada, S., Kuroda, S., Mackenzie, I.R., 2009. FUS pathology in basophilic inclusion body disease. *Acta Neuropathol.* 118, 617–627.
- Munoz, U., Bartolome, F., Bermejo, F., Martin-Requero, A., 2008. Enhanced proteasome-dependent degradation of the CDK inhibitor p27(kip1) in immortalized lymphocytes from Alzheimer's dementia patients. *Neurobiol. Aging* 29, 1474–1484.
- Nagy, Z., 2007. The dysregulation of the cell cycle and the diagnosis of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 402–408.
- Nagy, Z., Combrinck, M., Budge, M., McShane, R., 2002. Cell cycle kinesis in lymphocytes in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 317, 81–84.
- Neary, D., Snowden, J.S., Mann, D.M., 2000. Classification and description of frontotemporal dementias. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 920, 46–51.
- Neumann, M., Rademakers, R., Roeber, S., Baker, M., Kretschmar, H.A., Mackenzie, I.R., 2009. A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain* 132, 2922–2931.
- Neumann, M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Vanmassenhove, B., Kretschmar, H.A., Van Deerlin, V.M., Clark, C.M., Grossman, M., Miller, B.L., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2007. TDP-43-positive white matter pathology in frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 66, 177–183.
- Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., McCluskey, L.F., Miller, B.L., Masliah, E., Mackenzie, I.R., Feldman, H., Feiden, W., Kretschmar, H.A., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2006. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130–133.
- Nguyen, M.D., Mushynski, W.E., Julien, J.P., 2002. Cycling at the interface between neurodevelopment and neurodegeneration. *Cell Death Differ.* 9, 1294–1306.
- Timmermann, S., Hinds, P.W., Munger, K., 1997. Elevated activity of cyclin-dependent kinase 6 in human squamous cell carcinoma lines. *Cell Growth Differ.* 8, 361–370.
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobagyi, T., De Vos, K.J., Nishimura, A.L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., Ganesalingam, J., Williams, K.L., Tripathi, V., Al-Saraj, S., Al-Chalabi, A., Leigh, P.N., Blair, I.P., Nicholson, G., de Belleroche, J., Gallo, J.M., Miller, C.C., Shaw, C.E., 2009. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 323, 1208–1211.
- Wang, F., Gregory, C., Sample, C., Rowe, M., Liebowitz, D., Murray, R., Rickinson, A., Kieff, E., 1990. Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J. Virol.* 64, 2309–2318.
- Weinberg, R.A., 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323–330.

- Wishart, T.M., Parson, S.H., Gillingwater, T.H., 2006. Synaptic vulnerability in neurodegenerative disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 733–739.
- Yang, Y., Geldmacher, D.S., Herrup, K., 2001. DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 21, 2661–2668.
- Zhang, Y.J., Xu, Y.F., Dickey, C.A., Buratti, E., Baralle, F., Bailey, R., Pickering-Brown, S., Dickson, D., Petrucelli, L., 2007. Progranulin mediates caspase-dependent cleavage of TAR DNA binding protein-43. *J. Neurosci.* 27, 10530–10534.
- Zhou, J., Gao, G., Crabb, J.W., Serrero, G., 1993. Purification of an autocrine growth factor homologous with mouse epithelin precursor from a highly tumorigenic cell line. *J. Biol. Chem.* 268, 10863–10869.
- Zhou, X., Jia, J., 2010. P53-mediated G(1)/S checkpoint dysfunction in lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *Neurosci. Lett.* 468, 320–325.
- Zhu, X., Raina, A.K., Perry, G., Smith, M.A., 2004. Alzheimer's disease: the two-hit hypothesis. *Lancet Neurol.* 3, 219–226.

2

La inactivación de la vía CDK/pRb normaliza la supervivencia de los linfoblastos que expresan la mutación en *progranulina* c.709-1G>A, asociada con la DLFT-TDP

Carolina Alquezar, Noemí Esteras, Ainhoa Alzualde, Fermín Moreno, Matilde Sanchez-Ayuso, Adolfo López de Munain, Ángeles Martín-Requero.

“Inactivation of CDK/pRb pathway normalizes survival pattern of lymphoblasts expressing the FTLD-progranulin mutation c.709-1G>A” PLoS One. (2012) 7(5):e37057

Resumen

La mayoría de las mutaciones en el gen de progranulina (GRN) asociadas a la haploinsuficiencia de la proteína causan degeneración lobar frontotemporal asociada a la patología de TDP-43 (DLFT-TDP). Aunque se desconoce el mecanismo patogénico por el cual el déficit de PGRN causa la neurodegeneración, cada vez hay más evidencias de que algunas proteínas reguladoras del ciclo celular como las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) pueden estar involucradas en la pérdida neuronal asociada a diferentes síndromes neurodegenerativos. Resultados previos de nuestro laboratorio mostraban que la deficiencia de PGRN inducía un aumento en la actividad de la vía CDK6/pRb en linfoblastos que expresan la mutación c.709-1G>A.

En este trabajo hemos estudiado el papel de la vía CDK6/pRb en el control de supervivencia/muerte celular inducida por la retirada de suero usando líneas linfoblásticas establecidas a partir de individuos controles o portadores de la mutación c.709-1G>A, asintomáticos o pacientes de DLFT. Nuestros resultados sugieren que el aumento de la actividad de la vía CDK6/pRb en los linfoblastos deficientes en PGRN, permite a estas células escapar de la apoptosis inducida por la retirada del suero. Los tratamientos con inhibidores de la expresión o actividad de CDK6, butirato sódico y PD332991 respectivamente, fueron capaces de disminuir la vulnerabilidad de los linfoblastos de pacientes de DLFT-TDP frente a la ausencia de factores tróficos hasta niveles similares a los de los linfoblastos procedentes de individuos control. En conjunto, nuestros resultados sugieren que los linfoblastos deficientes en PGRN de pacientes de DLFT-TDP puede ser un buen modelo experimental para estudiar aspectos bioquímicos y celulares de esta enfermedad y que la vía CDK6/pRb puede ser una posible diana terapéutica para el tratamiento de la DLFT-TDP.

Inactivation of CDK/pRb Pathway Normalizes Survival Pattern of Lymphoblasts Expressing the FTLD-Progranulin Mutation c.709-1G>A

Carolina Alquezar^{1,5}, Noemí Esteras¹, Ainhoa Alzualde², Fermín Moreno³, Matilde S. Ayuso^{1,5}, Adolfo López de Munain^{2,3,4}, Ángeles Martín-Requero^{1,5*}

1 Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain, **2** Neuroscience Area-Institute Biodonostia, San Sebastian, Spain, **3** Department of Neurology, Hospital Donostia, San Sebastian, Spain, **4** CIBER de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain, **5** CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Valencia, Spain

Abstract

Background: Mutations in the progranulin (PGRN) gene, leading to haploinsufficiency, cause familial frontotemporal lobar degeneration (FTLD-TDP), although the pathogenic mechanism of PGRN deficit is largely unknown. Allelic loss of PGRN was previously shown to increase the activity of cyclin-dependent kinase (CDK) CDK6/pRb pathway in lymphoblasts expressing the c.709-1G>A PGRN mutation. Since members of the CDK family appear to play a role in neurodegenerative disorders and in apoptotic death of neurons subjected to various insults, we investigated the role of CDK6/pRb in cell survival/death mechanisms following serum deprivation.

Methodology/Principal Findings: We performed a comparative study of cell viability after serum withdrawal of established lymphoblastoid cell lines from control and carriers of c.709-1G>A PGRN mutation, asymptomatic and FTLD-TDP diagnosed individuals. Our results suggest that the CDK6/pRb pathway is enhanced in the c.709-1G>A bearing lymphoblasts. Apparently, this feature allows PGRN-deficient cells to escape from serum withdrawal-induced apoptosis by decreasing the activity of executive caspases and lowering the dissipation of mitochondrial membrane potential and the release of cytochrome c from the mitochondria. Inhibitors of CDK6 expression levels like sodium butyrate or the CDK6 activity such as PD332991 were able to restore the vulnerability of lymphoblasts from FTLD-TDP patients to trophic factor withdrawal.

Conclusion/Significance: The use of PGRN-deficient lymphoblasts from FTLD-TDP patients may be a useful model to investigate cell biochemical aspects of this disease. It is suggested that CDK6 could be potentially a therapeutic target for the treatment of the FTLD-TDP.

Citation: Alquezar C, Esteras N, Alzualde A, Moreno F, Ayuso MS, et al. (2012) Inactivation of CDK/pRb Pathway Normalizes Survival Pattern of Lymphoblasts Expressing the FTLD-Progranulin Mutation c.709-1G>A. PLoS ONE 7(5): e37057. doi:10.1371/journal.pone.0037057

Editor: Kelly Jordan-Sciotto, University of Pennsylvania, United States of America

Received: January 3, 2012; **Accepted:** April 12, 2012; **Published:** May 18, 2012

Copyright: © 2012 Alquezar et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work has been supported by grants from Ministry of Education and Science (SAF2007-61701, SAF2010-15700, SAF2011-28603), Fundación Eugenio Rodríguez Pascual, and Basque Government (Saiotek program 2008–2009). NE holds a fellowship of the JAE predoctoral program of the CSIC. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: amrequero@cib.csic.es

Introduction

Frontotemporal Lobar Degeneration (FTLD) is the second most common form of cortical dementia in the presenium, accounting for approximately 20% of dementia patients in this age group. In one of the most common forms of FTLD, there are deposits in the affected regions of ubiquitin-immunoreactive bodies containing mainly TDP-43 protein, and thus named FTLD-TDP [1]. FTLD-TDP is characterized by a widespread atrophy largely affecting the frontal, temporal, and parietal lobes with neuronal loss, reactive atrophy, and TDP-43 immunoreactive lesions [2]. The latter include neuronal cytoplasmic inclusions (NCI), less frequent oligodendroglial inclusions (GI), neuronal intranuclear inclusions (NII), and dystrophic neurites (DN). Various subtypes of FTLD-TDP have been proposed based on the proportion and distribution of the TDP-43 immunoreactive lesions [3,4]. A large subset of FTLD-TDP patients has been identified to harbor loss-

of-function mutations (including null mutations) in the gene encoding progranulin (PGRN) [5,6], and a smaller number of mutations in the valosin-containing protein (VCP) gene [7].

The relationship between PGRN deficiency and FTLD is largely unknown. PGRN is a 593 amino acid, 86 kDa cysteine-rich protein containing a signal peptide and 7.5 repeats of highly conserved granulin motifs [8]. PGRN is widely distributed [8], including the central nervous system (CNS) [4,5]. Previous research has suggested that PGRN may function as an autocrine neuronal growth factor involved in the inflammatory neuronal repair process in the CNS [9]. Recently, the finding that PGRN binds to the tumor necrosis factor receptor (TNFR) has provided a plausible mechanism to explain the anti-inflammatory action of PGRN [10].

PGRN has been reported to promote neuronal survival in culture [11], though the degree of this effect is controversial [12].

Conversely, PGRN-deficient neurons display reduced survival (but only in stressful conditions, e.g. following H₂O₂ administration) [13]. Studies utilizing non-neuronal cells suggest that PGRN can influence apoptosis [13–16].

We previously described a prevalent ancestral c.709-1G>A mutation related to Basque population [17,18]. The c.709-1G>A mutation results in null allele, as most of the pathogenic mutations described up to now, suggesting that FTLD in these families results from PGRN haploinsufficiency [5]. In a recent report from this laboratory, we described alterations in cell cycle-related proteins in lymphoblastoid cell lines derived from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of c.709-1G>A carriers. In particular, we detected enhanced levels and activity of CDK6 [19] associated with increased cell proliferation. These cell cycle disturbances were considered as systemic manifestations of the proposed aberrant cell cycle activation in neurodegenerative disorders including FTD [20,21]. On the other hand, there is a growing evidence for the involvement of cell cycle CDKs in neurodegenerative disorders and neuronal apoptosis [21–23]. Induction of CDKs occurs in vivo in mature adult neurons during focal stroke and kainate-induced excitotoxicity [24,25]. It is also seen in neuronal cultures deprived of trophic factors or treated with DNA damaging agents [23]. On these grounds, we found interesting to study the influence of PGRN deficiency on the CDK/pRb pathway and cell survival under conditions of serum deprivation. It is well known that a functional trophic factor deficiency in the microenvironment of vulnerable neurons plays a role in the etiopathogeny of neurodegenerative diseases [26,27].

Increasing evidences have suggested that subsets of biochemical dysfunctions affecting the brain of neurodegenerative diseases patients may also be traced outside the CNS [28]. Therefore peripheral cells, such as fibroblasts or blood lymphocytes have been extensively used in search for useful biomarkers that may correlate with expression and/or progression of the relative disease [29–31]. We demonstrated previously the usefulness of Epstein Barr Virus (EBV)-immortalized lymphocytes to study cell survival/death mechanisms in AD [32–35]. Since cellular response is not affected by the viral transformation [32–36], the lymphoblastoid cell lines resulting from the EBV transformation represent an easy form to obtain unlimited material to study regulatory mechanisms associated to neurodegeneration. In this work, we carried out a comparative analysis of vulnerability to different noxious stimuli in immortalized lymphocytes from control subjects and individuals carrying the PGRN mutation c.709-1G>A, asymptomatic or suffering from FTLD-TDP. Here, we report an increased resistance to serum withdrawal-induced apoptosis in non-neuronal cells carrying the c.709-1G>A PGRN mutation linked to FTLD-TDP. The protective mechanism involves increased CDK6 activity and it is accompanied by decreased caspase activation and lower dissipation of mitochondrial membrane potential. CDK6 inhibitors sensitize PGRN mutation positive cells to serum withdrawal-induced apoptosis. It is suggested that CDK6 can be a therapeutic target for FTLD-TDP patients.

Results

Cellular Response to Stress in Control and c.709-1G>A PGRN Carriers Lymphoblasts

We first studied the cellular response to various insults previously known to cause cell death, such as H₂O₂, 2-deoxy-D-ribose (2dRib) [44,45] or serum deprivation, in lymphoblasts from control and c.709-1G>A carriers. As shown in Table 1, the oxidative noxae, H₂O₂ or 2dRib induced cell death in control and

Table 1. Cellular response to stress in control and c.709-1G>A PGRN carriers lymphoblasts.

Condition	% of surviving Cells		
	Control	Asymptomatic	FTLD Patients
H ₂ O ₂ (100 μM)	58±6	66±4	67±4
2dRib (30 mM)	69±1	67±8	66±4
SW	66±4	95±3*	92±3*

Lymphoblasts from control and c.709-1G>A PGRN carriers were incubated in serum-free RPMI medium for 72 h (SW) or with 10% FBS in the presence of H₂O₂ or 2 deoxy Ribose (2dRib) for 24 h. The cells were then counted by Trypan blue dye exclusion or by the MTT methods. Results are expressed as % of the number of cells at day 0, and are the mean±SE of four independent experiments. Statistical difference: *p<0.05 from lymphoblasts from control individuals.

doi:10.1371/journal.pone.0037057.t001

PGRN deficient cells. A trend towards more resistance to cell death was observed in PGRN deficient cells although there was no statistically significance. In contrast, lymphoblasts carrying the PGRN mutation appear to be resistant to cell death induced by serum withdrawal.

The serum dependence of cell survival for control or PGRN deficient lymphoblasts is shown in Fig. 1A. As expected, the cell number was significantly higher in cultures of c.709-1G>A carriers in the presence of progressively decreasing serum concentrations. This observation is in consonance with previous work demonstrating enhanced proliferative activity in lymphoblasts carrying the PGRN mutation c.7091-G>A [19]. Following 72 h of serum deprivation, the number of cells in control cultures was below the initial seeding while the number of PGRN deficient lymphoblasts did not change. No differences were observed in the proliferative activity (as assessed by BdU incorporation) of control and c.709-1G>A carriers cells under serum replacement (Fig. 1B), thus ruling out that enhanced proliferation could mask the resistance of PGRN deficient cells to serum deprivation-induced death. Data in Fig. 1C summarizes the kinetics of the cellular response to serum deprivation of all cell lines used in this study, derived from carriers of the c.709-1G>A PGRN mutation, asymptomatic and FTLD affected cases, and control individuals. In control cultures, near 30% of cells died after 3-day period of serum starvation, whereas less than 10% of PGRN mutated cells died during the same period of time. It is noteworthy that there was no differences in survival between cells from asymptomatic or patients.

Serum Withdrawal Induces Apoptosis

Because cell death can occur via apoptosis or necrosis, it was important to determine which mechanism was involved in serum-starved cells. Apoptosis is characterized by a number of morphological and biochemical events that distinguish it from necrosis. Serum withdrawal-induced cell death was therefore assessed by different procedures. These include 1) flow cytometric analysis of cellular DNA content, 2) microscopic examination of nuclei stained with DAPI, 3) dependence of caspase activity, 4) flow cytometric analysis of mitochondrial membrane potential following serum deprivation, 5) flow cytometric analysis of executive caspases activity by using the Vybrant FAM Caspase-3 and 7 kit (Invitrogen), and 6) assessment of cytochrome c release from the mitochondria. Fig. 2A shows the cell cycle status before and after serum deprivation in control and c.709-1G>A PGRN mutation bearing lymphoblasts. It is shown a higher accumulation

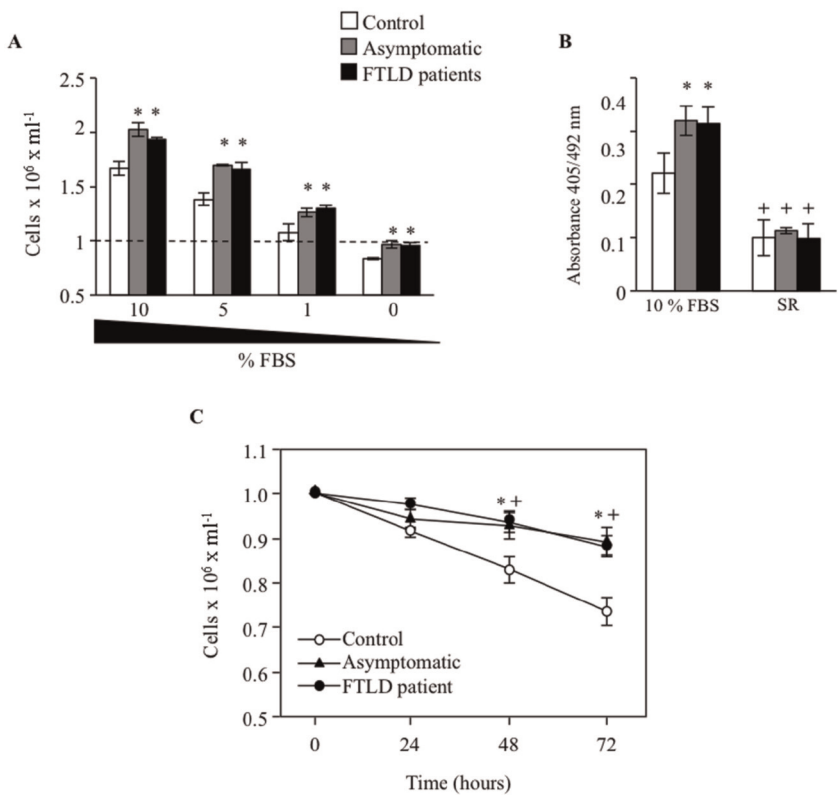


Figure 1. Influence of PGRN haploinsufficiency on cell response to serum stimulation or withdrawal. A: Immortalized lymphocytes from control and c.709-1G>A carriers, FTLD patients or asymptomatic individuals were seeded at an initial density of 1×10^6 /ml and incubated in RPMI medium with decreasing concentrations of FBS or in the absence of serum for 72 h. Cell viability was determined by trypan blue exclusion under inverted phase-contrast microscopy. Data are the mean \pm SE for at least four independent experiments carried out with cell lines from different individuals * $p < 0.01$ significantly different from control cells. B: Proliferative response of control and PGRN deficient cells in the presence or in the absence of serum. Lymphoblasts (5000 cells/well) were seeded in 96-well plates in the presence of 10% FBS or serum replacement (SR). After 24 h, cells were pulsed with 10 μ M BrdU for 4 h. DNA synthesis was assessed by BrdU incorporation method according to the manufacturer's instructions. Proliferation was expressed as absorbance of stimulated minus that of nonstimulated cultures. Each bar represents the mean \pm SE of three independent experiments performed in triplicate. C: Effect of PGRN deficiency on the serum deprivation-induced cell death. Lymphoblasts from control and c.709-1G>A carriers, FTLD patients or asymptomatic individuals were seeded as above and incubated in serum-free RPMI medium for 72 h. Cells were harvested every day thereafter and cell viability was determined by trypan blue exclusion under inverted phase-contrast microscopy. Data shown are the mean \pm SE of all cell lines used in this study (see Table 2). * and * $p < 0.05$ differences significantly different between control and asymptomatic or FTLD patients respectively. doi:10.1371/journal.pone.0037057.g001

Table 2. Demographic characteristics of the subjects enrolled in the study.

	Control n = 10	c.709-1G>A	
		Asymptomatic n = 12	FTLD Patients n = 7
Age (years)	52 \pm 4	53 \pm 4	65.4 \pm 2.6
Age range	(31–70)	(35–72)	(54–70)
Gender (Male/Female)	5/5	6/6	6/0
PGRN level (range)	95–170	29–61	20–57

Control: individuals without sign of neurological degeneration. Key: c.709-1G>A, progranulin mutation; FTLD, frontotemporal lobar degeneration. doi:10.1371/journal.pone.0037057.t002

of hypodiploid nuclei, following serum withdrawal, in control cultures than in PGRN mutated lymphoblasts. Fig. 2B shows a representative experiment demonstrating chromatin condensation in the nucleus of PGRN mutated cells. As control of apoptosis use was made of staurosporine.

To address whether or not the activity of caspases was essential for the observed increase in apoptosis after serum withdrawal, lymphoblasts from control and PGRN mutation carriers were treated with a general caspase inhibitor (z-VAD-fmk). Fig. 3A shows that this compound prevented apoptosis in control cells, without affecting survival of lymphoblasts from c.709-1G>A carriers (either asymptomatic or FTLD patients). The green fluorescent probe FLICA, binds irreversibly to activated caspases 3 and 7, thus increasing the fluorescent signal in apoptotic cells. The assessment of the cell distribution of FLICA fluorescent signal in serum deprived control and PGRN mutated lymphoblasts indicates a higher increase in the activity of executive caspases 3 and 7 in control cells as compared with cells carrying the c.709-

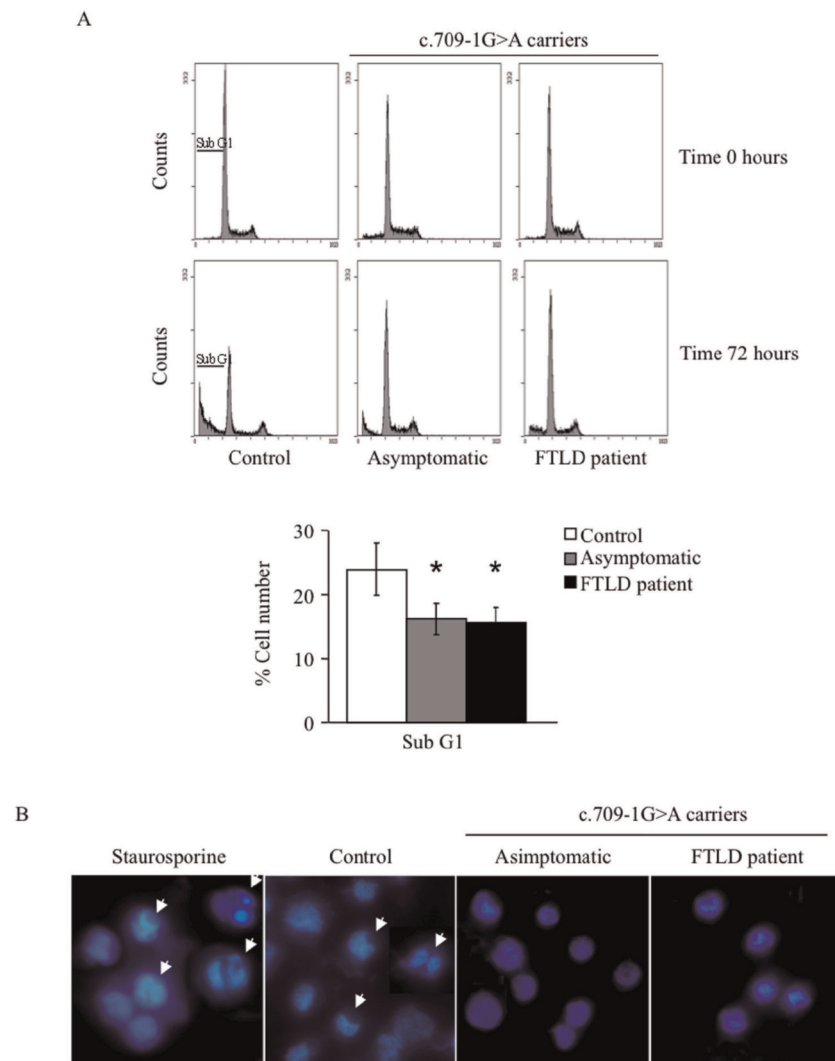


Figure 2. Serum withdrawal induces apoptosis. A: Effect of serum deprivation on distribution of control and c.709-1G>A lymphoblasts in cell cycle. The experimental conditions are identical to those described in the legend of Fig. 1. Cells were harvested before and after 72 h of serum deprivation, fixed and analyzed by flow cytometry as described under Materials and Methods. The percentage of sub-G₀/G₁ hypodiploid cells is represented below. Data shown are the mean \pm SE of different experiments carried out with cell lines from eight control subjects, eight asymptomatic and seven FTLD patients, carrying the PGRN c.709-1 G>A mutation, respectively. * p <0.05 significantly different from control cells. B: Representative photomicrograph showing the presence of chromatin condensation/fragmentation (arrows) in the nuclei of control cells following 72 h of serum withdrawal. As a control of apoptosis, cells from non-demented individuals were treated with 1 μ M staurosporine for 5 h. Nuclei were stained with DAPI.

doi:10.1371/journal.pone.0037057.g002

1G>A mutation, whether they are asymptomatic or FTLD patients (Fig. 3B).

Changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Phi_m$) were determined by using the fluorescent probe JC-1. After 72 h of serum deprivation, control and c.709-1G>A PGRN mutation carrier cells showed certain degree of mitochondrial membrane depolarization as indicated by a decrease in the red (H)/green (L) JC-1 fluorescence ratio (Fig. 4A). However, there were important differences in the extent of depolarization. After 72 h of serum deprivation (Fig. 4B right panel) the drop in red/green fluorescence ratio was significantly decreased in control cells, while

PGRN deficient cells, from asymptomatic or FTLD patient, were only slightly depolarized as expected because of the lack of cell death detected in these conditions. No differences in membrane potential were observed in control and PGRN mutated cells prior to serum starvation (Fig. 4B left panel).

The release of mitochondrial cytochrome c following serum deprivation further indicates the activation of the “intrinsic” (mitochondrial initiated) apoptotic pathway. Fig. 5 shows that serum deprivation-induced release of cytochrome c to the cytosolic compartment is enhanced in control lymphoblasts compared with the c.709-1G>A PGRN mutation bearing cells.

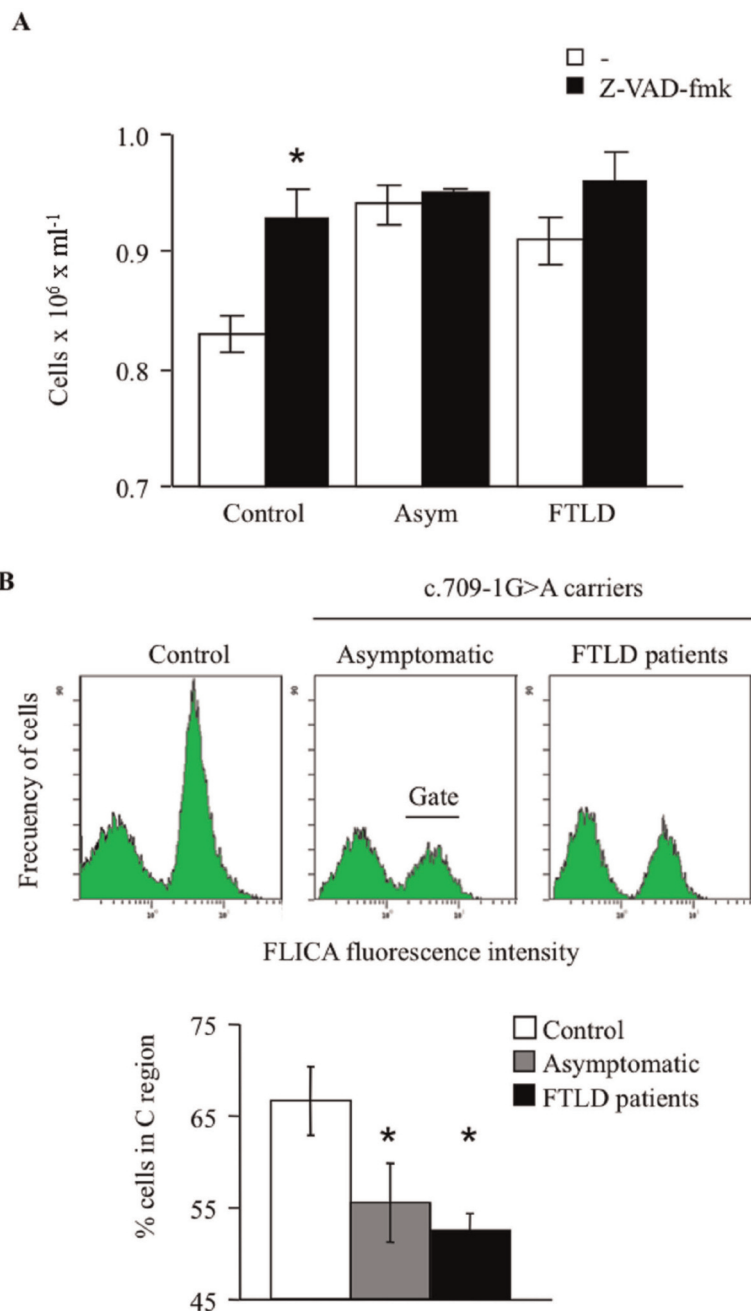


Figure 3. Serum deprivation-induced apoptosis is accompanied by changes in caspase activation. A: Influence of the pan-caspase z-VAD-fmk inhibitor on survival of lymphoblasts derived from control, asymptomatic and FTLD patients following serum deprivation. Cells were seeded at an initial density of 1×10^6 /ml and incubated in serum-free RPMI medium for 72 h in the absence or in the presence of 50 μ M z-VAD-fmk for 72 h. Results shown are the mean \pm SE of different experiments carried out with cell lines from four control subjects, asymptomatic or FTLD patients, carrying the PGRN c.709-1G>A mutation, respectively. * $p < 0.05$ significantly different from control cells. B: Caspase activation in serum-deprived lymphoblasts from control and c.709-1G>A carriers. Cells were incubated as above and then labeled with the FLICA reagent, following the manufacture's recommendation to detect its binding to active caspases 3 and 7. A representative flow cytometric analysis of the frequency distribution of cells according their green fluorescence is showing. Below it is shown the percentage of cells with active caspases 3 and 7 (mean \pm SE) of 3 observations carried out in different cell lines from control or c.709-1G>A PGRN mutation carriers individuals. * $p < 0.05$ significantly different from control cells.

doi:10.1371/journal.pone.0037057.g003

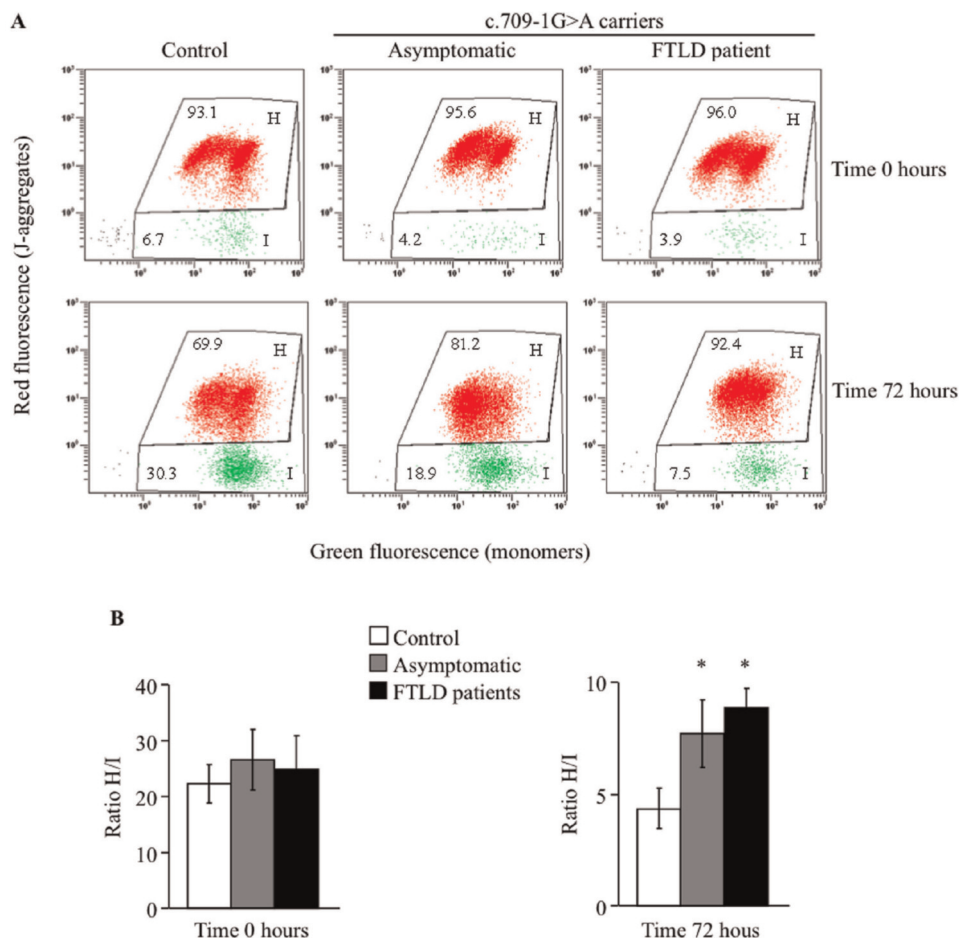


Figure 4. Mitochondrial membrane potential in lymphoblasts from control and c.709-1G>A carrier individuals. A: Lymphoblasts from control and c.709-1G>A carriers (asymptomatic and patients) were labeled with the probe JC-1 following manufacturer's directions before and 72 h after serum withdrawal. Representative flow cytometric analysis of the frequency distribution of cells according their red or green fluorescence, corresponding to the aggregated or monomeric form of the JC-1 probe is presented. B: The ratio aggregated/monomeric (H/I) form of the JC-1 probe was determined before (left panel) and after 72 hours of serum deprivation (right panel). Values shown are the mean±SE of seven observations carried out in different cell lines from control, asymptomatic or FTLD patients. *p<0.05 significantly different from control cells. doi:10.1371/journal.pone.0037057.g004

Role of CDK/pRb Pathway on Cell Survival

Previous work from this laboratory indicated that the c.709-1G>A PGRN mutation carriers showed increased activity and levels of CDK6 protein under proliferating conditions [19]. We were interested in evaluating the role of the CDK6/pRb pathway in the survival/death of these cell lines under serum deprivation conditions. First, we determined by quantitative RT-PCR the expression levels of mRNA CDK6 and, by Western blot analysis, the levels of CDK6 and pRb in control and PGRN mutated cells following serum withdrawal. Fig. 6A, shows that both the mRNA levels of CDK6 and protein content increased in PGRN mutated cells incubated in the absence of serum. Taken together our results suggest that increased expression of CDK6 is a distinct feature of PGRN deficient lymphoblasts independent of the presence or absence of serum. CDK6 activity, assessed by pRb and p130 phosphorylation status was increased in c.709-1G>A PGRN mutation carrying cells, either asymptomatic or FTLD patients (Fig. 6B). No

differences were found in the levels of cyclins D1, D2 and D3 or in the CDK inhibitors p16 and p18 between control and PGRN-deficient lymphoblasts (Fig. 6C).

We next inhibited CDK6 activity with an inhibitor of histone deacetylases (HDAC) to blunt the CDK6 mRNA expression, such as sodium butyrate (SB). Incubation of cells with SB induced down-regulation of CDK6 mRNA, reduced protein levels and the phosphorylation status of pRb (Fig. 7A,B) and sensitized PGRN mutated cells to serum deprivation-induced cell death (Fig. 7C). Cell survival of control cells was not affected by this dose of SB (10 μ M). This dose of SB was proven to be effective in blunting the enhanced proliferative response of PGRN deficient lymphoblasts [19]. On the other hand, we specifically inhibited CDK6 activity with the small molecule PD332991 (Pfizer). We observed that increasing concentrations of this compound (0.5 to 2.5 μ M) induced cell death of control and PGRN deficient lymphoblasts in a dose-dependent manner (data not shown). Maximal effects were observed at 1 μ M PD332991. Treatment of control and PGRN

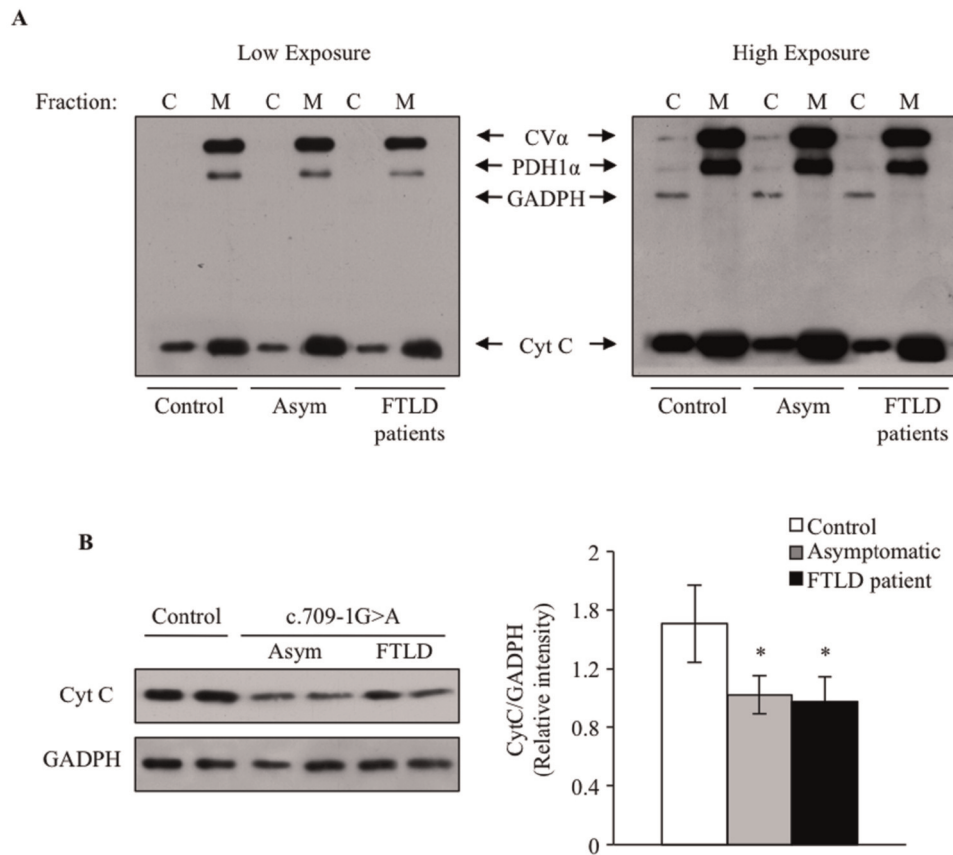


Figure 5. Enhanced release of cytochrome c to the cytosol in serum-deprived lymphoblasts bearing the c.709-1G>A PGRN mutation. A: Lymphoblasts from control and c.709-1G>A carriers were serum deprived for 72 h. Cell lysates were fractionated to isolate cytoplasmic and crude mitochondria. The presence of cytochrome c in cytosolic and mitochondrial fractions was assessed by WB analysis using the ApoTrack antibody cocktail, which demonstrates the purity of the fractions and loading. A representative blot of three independent experiments is shown. B: Cytochrome c detection in cytosolic extracts from control and PGRN deficient lymphoblasts. A representative immunoblot showing cytosolic cytochrome c in two different individuals for each condition is shown (left panel). Densitometric analysis is presented in the right panel. The data represent the mean±SE of the cytosolic cytochrome c for four observations in different cell lines. *p<0.05 significantly different from control cells. doi:10.1371/journal.pone.0037057.g005

mutated cells with this dose of PD332991, induced dephosphorylation of pRb protein without changes in the CDK6 mRNA and protein levels in control and PGRN deficient cells (Fig. 7D y E). This treatment sensitized c.709-1G>A PGRN mutation carrier cells to serum deprivation-induced apoptosis and increased death of control lymphoblasts (Fig. 7F).

Role of PGRN Haploinsufficiency on the Survival of Immortalized Lymphocytes

To further understand the influence of PGRN deficiency on cell survival, we added recombinant PGRN in the presence or in the absence of CDK6 inhibitors, to the culture medium. Fig. 8 shows that exogenous PGRN mimicked the proapoptotic effects of SB, while cooperated with PD332991 to produce a greater inhibition of phosphorylation of pRb protein and cell survival in PGRN deficient cells. While PGRN or SB did not affect either phosphorylation of pRb or survival of control cells, inhibiting CDK6 activity by PD332991, alone or in combination of PGRN, greatly decreased the phosphorylation of pRb and consequently raised the vulnerability of control cells to serum deprivation.

Taken together these results suggest that exogenous PGRN blunted the enhanced CDK6 mRNA expression levels in PGRN deficient cells. Interestingly, the treatment of PGRN deficient cells with exogenous PGRN in the presence of serum had similar effects than SB in preventing the increased proliferative response of these cell lines. Moreover exogenous PGRN and PD332991 showed also additive effects in decreasing cell proliferation (results not shown). These observations highlight the important role of CDK6/pRb pathway in determining the cell fate, survival/death depending on growth factors availability.

Discussion

Results presented herein indicate that immortalized lymphocytes from c.709-1G>A PGRN mutation carriers, asymptomatic or FTLD patients are more resistant to cell death induced by serum deprivation than those derived from control individuals. These cell lines were previously found to show enhanced proliferative activity upon serum stimulation [19]. These neoplastic-like features of PGRN deficient lymphoblasts may be

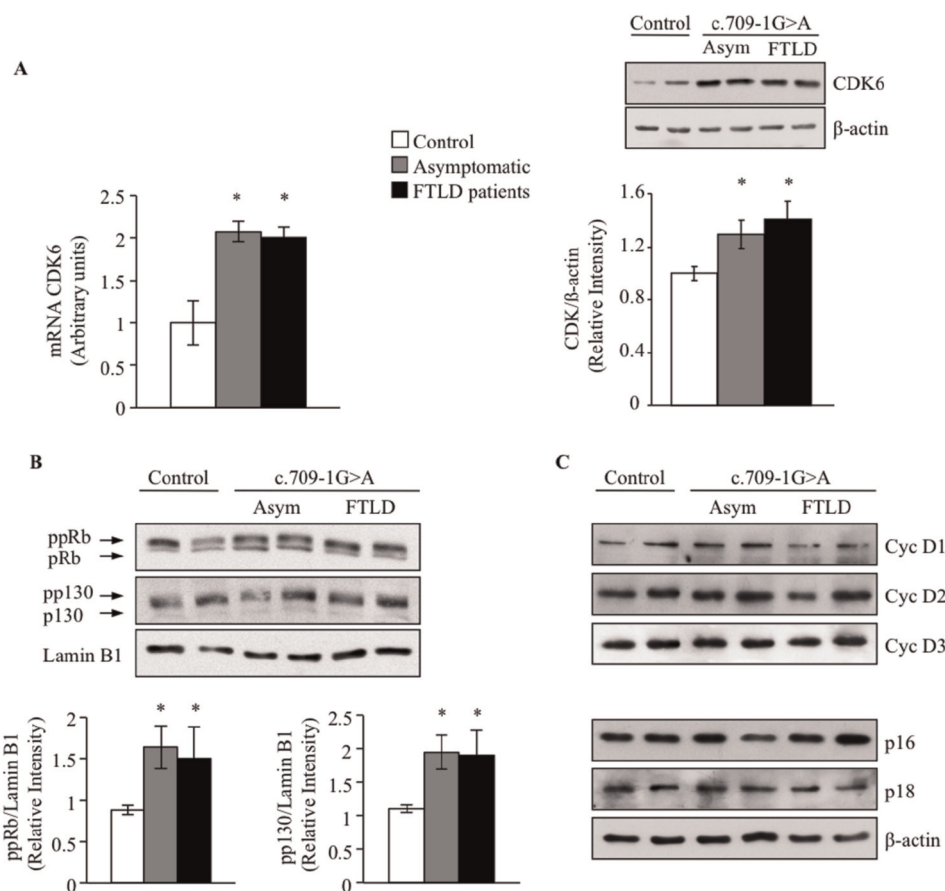


Figure 6. CDK6 mRNA, protein levels and pRb phosphorylation in lymphoblasts from control and c.709-1G>A carriers individuals. Immortalized lymphocytes from control and c.709-1G>A carriers, FTLD patients or asymptomatic individuals were seeded at an initial density of 1×10^6 /ml and incubated in serum-free RPMI medium. 48 hours later cells were harvested to isolate RNA and to prepare cell lysates. A: CDK6 mRNA expression levels were analyzed by quantitative RT-PCR (left panel), and the CDK6 protein content was analyzed by WB (right panel). The immunoblot shows two different cell extracts from control, asymptomatic and FTLD patients is shown. The data represent the mean \pm SE for six observations in different cell lines. * $p < 0.05$ significantly different from control cells. B: Representative immunoblots showing pRb and p130 phosphorylation status in two different control, asymptomatic or FTLD individuals is shown. pp= the hyperphosphorylated form of the pRb or the p130 protein. Below it is shown the densitometric analysis of the hyperphosphorylated form of pRb and p130. Data represent the mean \pm SE for six independent observations in different cell lines. C: Representative immunoblots showing the cellular content of Cyclin D1, D2 and D3, and the CDK inhibitors p16 y p18 in two different control, asymptomatic or FTLD individuals. doi:10.1371/journal.pone.0037057.g006

systemic manifestations of cell cycle-related events associated with neurodegeneration, as described in several diseases of the Central Nervous System (CNS) [46–49]. We and others reported previously a selective impairment of mechanisms involved in cell death in peripheral cells from Alzheimer's disease patients [32,50–52]. Moreover, we demonstrated that the immortalization procedure did not alter the cellular response of fresh obtained lymphocytes, to addition or withdrawal of mitogenic factors [32,36], thus providing support for considering lymphoblastoid cell lines as suitable model to study cell survival/death mechanisms regulation associated with neurodegeneration and for testing novel modifying-disease therapies.

Cell death induced by serum deprivation showed characteristics of apoptosis. The lower sensitivity of PGRN deficient cells to trophic factors withdrawal was accompanied by lower dissipation of $\Delta\Phi_m$, decreased activation of capases 3 and 7, and reduced

cytochrome c release from the mitochondria, compared with control cells.

c.709-1G>A PGRN mutated cells treated with inhibitors of CDK6 activity undergo significant apoptosis in the absence of serum in the culture medium as they do control cells, suggesting a role of the CDK/pRb signaling pathway in protecting PGRN deficient cells from apoptosis. The effects of SB and PD332991 on survival of lymphoblasts bearing the PGRN mutation are in line with the reported effects of PD332991 on myeloma cells inhibiting cell cycle progression and increasing the cell sensitivity to bortezomib-induced apoptosis [53]. Considering that CDK6 inhibitors are already being used for treatment of a number of human tumors [54] with a good tolerance, it is plausible that they may serve as novel therapeutic drugs for FTLD.

The observed enhanced CDK/pRb activity of PGRN deficient lymphoblasts contrasts with the fact that increased CDK activity

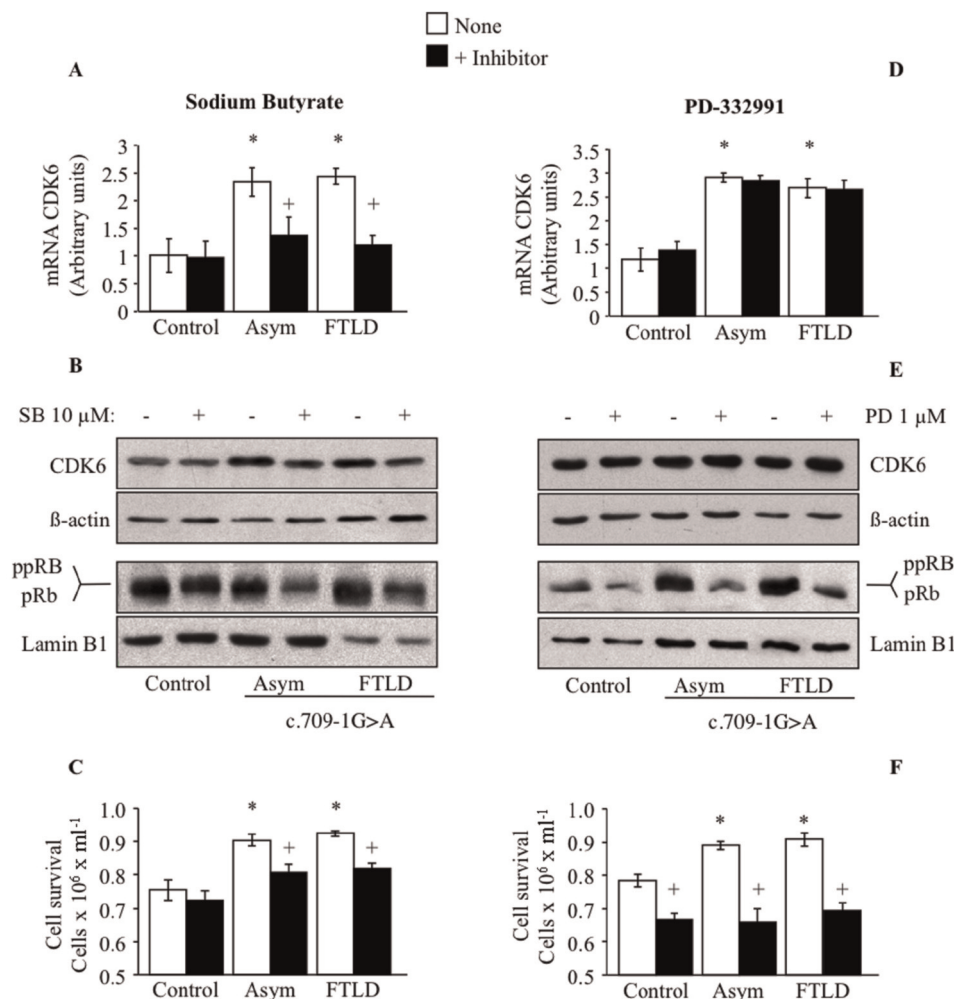


Figure 7. Effects of sodium butyrate and PD332991 on CDK6 mRNA and protein levels and in the survival of control and c.709-1G>A carriers lymphoblasts. Lymphoblasts were incubated as in the legend of Fig. 6 in the absence or in the presence of 10 μ M SB (A, B and C) or 1 μ M PD332991 (E, F and G) for 48 h. CDK6 mRNA analysis was performed by quantitative RT-PCR, protein levels were assessed by WB. Cell survival was determined by trypan blue exclusion under inverted phase-contrast microscopy. Values shown are the mean \pm SE for four independent observations carried out in different cell lines. * p <0.05 significantly different from control cells. ** p <0.05 significantly different from untreated cells. doi:10.1371/journal.pone.0037057.g007

and pRb phosphorylation have been linked to neuronal death in a number of cell and animal models of neurodegeneration [55,56]. However, one has to take into account that alteration of cell cycle-related events in brain and lymphocytes have different consequences. Lymphocytes from PGRN mutation carrier individuals show enhanced proliferative activity [19] and increased resistance to serum deprivation-induced cell death than cells derived from control individuals. On the other hand, cell cycle disturbances in already adult neurons results in cellular dysfunction, premature cell death, and thus neurodegeneration [57]. It is worth mentioning that CDK6 inhibitors addition to PGRN mutated lymphoblasts were able to restore the “normal” cell response to serum stimulation [19] or withdrawal (this manuscript), by blunting the enhanced proliferative activity or sensitizing cells to apoptosis in the absence of serum. In both situations, CDK6 inhibitors decreased the levels of phosphoryla-

tion of pRb protein in c.709-1G>A carrier cells to reach those of control cells. It remains to be demonstrated whether CDK6 inhibitors would protect neurons in FTLD brain from apoptosis by modulating the CDK6/pRb pathway, but it has been suggested that SB and other HDAC inhibitors behave as neuroprotective drugs [58]. These compounds prolonged the life span of cultured cortical neurons [59] and promoted neuronal growth. Work carried out in vivo demonstrated that they protected neurons from ischemic stroke [60]. A neuroprotective effect of these drugs has also been reported in animal models of neurodegenerative disorders [61,62].

The proapoptotic effect of SB in PGRN mutated cells appears to be directly related to PGRN insufficiency since it was mimicked by the addition of recombinant PGRN. The fact that exogenous PGRN mimicked the SB effects but cooperate with the inhibitor of CDK6 activity PD332991 on cell survival, points out to the

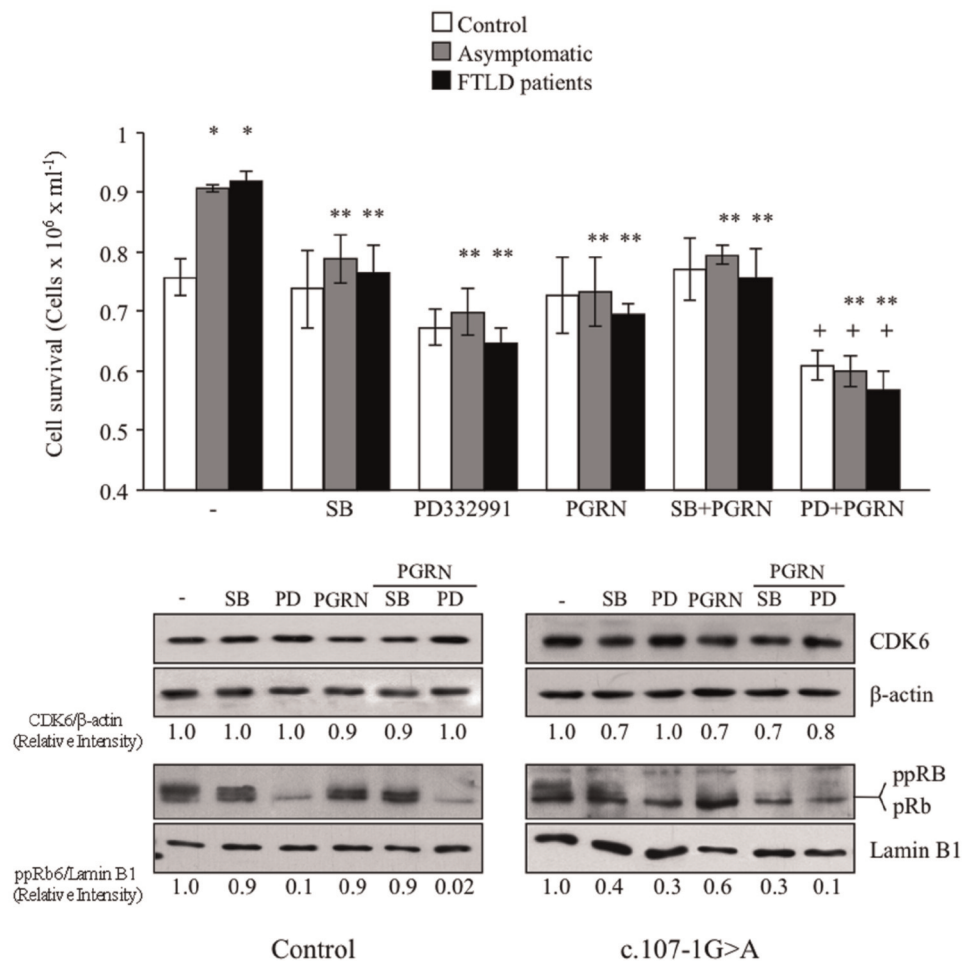


Figure 8. Effects of exogenous progranulin in the serum deprivation-induced cell death. Lymphoblasts from control or c.709-1G>A carriers individuals were incubated in serum-free RPMI medium in the absence or in the presence of recombinant PGRN (100 ng/ml), alone or in combination with 10 μ M SB or 1 μ M PD332991. Cell survival was determined after 72 hours of serum deprivation. Data shown are the mean \pm SE of four determinations carried out with different cell lines. * p <0.05 significantly different from control cells. ** p <0.05 significantly different from untreated cells. + p <0.05 significantly different from cells treated with PGRN alone. Below it is shown representative immunoblots showing the effects of these drugs, alone or in combination of exogenous progranulin on CDK6 and pRb proteins levels. doi:10.1371/journal.pone.0037057.g008

alteration of CDK6 transcription as the major cause of aberrant cell survival/death response of PGRN deficient cells. The expression of CDK6 is negatively regulated by TDP-43 [63]. The control of CDK6 expression mediated by TDP-43 involves GT repeats in the target gene sequence. Several reports indicate that PGRN deficiency induced mislocalization of TDP-43 protein leading to a loss of the DNA-RNA binding function of the protein [64,65]. Indeed an increase in the cytosolic content of TDP-43 protein could be observed in c.709-1G>A bearing lymphoblasts, associated with increased levels of CDK6 [19]. It appears therefore that altered DNA/RNA binding protein function, rather than toxic aggregation is central to TDP-43-related neurodegeneration. Two recent reports support this asseveration, the first one indicates that there is no correlation between protein aggregates formation and severity of the disease [66] while the second suggests that TDP-43 function is required for cell survival in ALS [67].

Our results show no differences in the cellular response to serum deprivation and content of CDK6 among lymphoblasts derived from c.709-1G>A mutation carriers, asymptomatic or presenting already clinical signs of dementia. Since most of the asymptomatic carriers are younger than the patients, this finding suggests that dysfunction of cell survival could be an early manifestation of the disease. Nonetheless, there are c.709-1G>A carriers that remain asymptomatic until advanced age suggesting that the altered cell survival/death response is not sufficient to cause the disease and there must be other genetic or environmental factors in determining the onset of clinical disease. The reason for the distinct vulnerability to serum deprivation of PGRN deficient cells cannot be ascertained with the present data. However, the possibility should be considered that changes in signaling molecules and/or receptors might be altered. On these grounds, it is worth to mention that it has been recently reported disturbances in circulating levels of several cytokines in

the serum of asymptomatic and FTLT patients carriers of loss-of-function PGRN mutations [68]. On the other hand, a recent functional genomic study had revealed changes in Wnt signaling pathway in PGRN deficient cells and demonstrated upregulation of the FZD2 receptor in PGRN knockdown mice [69]. It was suggested FZD2 could play a potentially neuroprotective role in PGRN deficient cells. Moreover, TNF receptor has been identified as a PGRN binding receptor [10]. Therefore, progranulin haploinsufficiency could eventually potentiate TNF- α signaling. Whether similar mechanisms operate in lymphocytes from carriers of c.709-1G>A PGRN mutation is currently under investigation in our laboratory.

Finally, an issue that needs to be taken into account for discussion purposes is that although FTLT associated changes detected in peripheral cells might not fully reflect those in FTLT brain, it is evident that besides neuronal damage there are also peripheral aspects of the disease. A close relationship seems to exist between the state of the immune system, and particularly lymphocytes, and some psychiatry disorders including AD [70]. As far as we know, clinical disturbances in the immune system have not been reported in FTLT. However it is possible that some factors, including neuroinflammatory cytokines that link the peripheral immune and nervous systems can influence neuronal survival in FTLT.

In summary, we provide evidence that CDK6/pRb signaling pathway is enhanced in PGRN deficient cells, associated with altered cell vulnerability to trophic factor deprivation. Exogenous PGRN and inhibitors of CDK6 activity were able to restore the normal cell response. It is suggested that the inhibition of CDK6 activity or alternatively the modulation of PGRN levels may have a beneficial effect on FTLT-TDP. Taken together our results with the recent findings that alkalinizing drugs [71] or the FDA-approved HDAC inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) are able to increase PGRN levels [72], it is possible to envision new promising avenues for therapeutic intervention in FTLT-TDP.

Materials and Methods

Materials

All components for cell culture were obtained from Invitrogen (Barcelona, Spain). The kinase inhibitor PD332991 was kindly provided by Pfizer. The inhibitor of histone deacetylases sodium butyrate (SB), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT), 2-Deoxy-D-ribose (2dRib) and H₂O₂ were obtained from Sigma-Aldrich. The caspase inhibitor benzyloxy-carbonyl-Val-Asp-fluoromethylketone (z-VAD-fmk) was obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany) and 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) was obtained from Serva (Heidelberg, Germany). Progranulin (human) (recombinant) was obtained from Enzo (Life Sciences). Poly (vinylidene) fluoride (PVDF) membranes for western blots were purchased from Bio-Rad (Richmond, CA). Antibodies against human Cdk6, pRb, p130, p16, p18 were obtained from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). Antibodies against Cyclin D1, D2 and D3 were obtained from Cell Signaling, antibody against Lamin-B1 was obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany) and antibody against β -actin was obtained from Sigma-Aldrich. ApoTrackTM cytochrome c Apoptotic WB antibody cocktail (ab110415) was obtained from MitoSciences (Eugene, Oregon, US). The enhanced chemiluminescence (ECL) system was from Amersham (Uppsala, Sweden). Other reagents were of molecular biology grade.

Study Samples and Cell Lines

A total of 29 individuals were enrolled in this study. We studied 19 individuals with a single pathogenic splicing mutation in the PGRN gene (c.709-1G>A), 7 of them patients of FTLT-TDP, 12 asymptomatic and 10 control individuals without mutation in PGRN nor any sign of neurological degeneration. All patients were of Basque descent. Asymptomatic and control individuals were relatives of patients. All patients were diagnosed as FTD in the Donostia Hospital by applying consensus criteria as published elsewhere [37]. Patients exhibited variable phenotype initial symptoms. Four of them presented the behavioral variant of frontotemporal dementia (bv-FTD), one progressive nonfluent aphasia, and corticobasal basal syndrome (CBS), the other patients developed a relatively rapidly progressive dementia with features that led to a secondary diagnosis. Notably, this secondary diagnosis was CBS in three of the bv-FTD cases. It is shown that PGRN levels in plasma were strongly reduced in affected and unaffected subjects carrying the c.709-1G>A mutation. Table 2 summarizes the demographic characteristics and the plasma levels of PGRN of all subjects enrolled in this study.

All study protocols were approved by the Donostia Hospital and the Spanish Council of Higher Research Institutional Review Board and are in accordance with National and European Union Guidelines. In all cases, peripheral blood samples were taken after written informed consent of the patients or their relatives to determine the presence of the c.709-1G>A PGRN mutation and to establish the lymphoblastoid cell lines.

DNA was extracted from blood cells using standard procedures. PGRN gene sequencing procedures used at our laboratory have been published elsewhere [17]. For determination of PGRN plasma levels we used an ELISA kit (AdipoGene, Korea).

Establishment of lymphoblastoid cell lines was performed in our laboratory as previously described [38], by infecting peripheral blood lymphocytes with the Epstein Barr virus [39]. Cells were grown in suspension in T flasks in an upright position, in approximately 10 ml of RPMI-1640 (Gibco, BRL) medium that contained 2 mM L-glutamine, 100 μ g/ml penicillin/streptomycin and, unless otherwise stated, 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and maintained in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C. Medium was routinely changed every two days.

Determination of Cell Proliferation

Cell proliferation was assessed by the 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation method using an enzyme-linked immunoassay kit procured from Roche (Madrid, Spain). Cells (5000 cells/well) were seeded in 96-well microtiter plates. Four hours prior to the end of the interval of measurement, BrdU (10 μ M) was added. The cells were fixed with precooled 70% ethanol for 30 min at -20°C and incubated with nucleases following manufacturer's recommendations. Cells were then treated for 30 min at 37°C with peroxidase-conjugated anti-BrdU antibody. Excess antibody was removed by washing the cells three times, followed by the addition of substrate solution. Absorbance was measured at 405 nm with a reference wavelength of 492 nm.

Cell Survival Assay

The cell suspension was mixed with a 0.4% (w/v) trypan blue solution and the number of live cells was determined using a hemocytometer. Cells failing to exclude the dye were considered nonviable. In some experiments cell viability was checked by the MTT assay [40] obtaining similar results.

Assessment of Apoptosis and Caspase Activity

Flow cytometry was performed to determine the content of apoptotic sub-G1 hypo-diploid cells [41]. Exponentially growing cultures of cell lines were seeded at an initial concentration of 1×10^6 cells/ml and cultured for 72 h in serum-deprived RPMI medium. Then, cells were fixed in 75% ethanol for 1 h at room temperature. Subsequent centrifugation of the samples was followed by incubation of cells in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 μ g/ml RNase at room temperature for 20 min and staining with propidium iodide (PI) (25 μ g/ml). Cells were analyzed in an EPICS-XL cytofluorimeter (Coulter Científica, Móstoles, Spain). Estimates of cell cycle phase distributions were obtained by computer analysis of DNA content distribution. In addition, apoptosis was characterized by chromatin condensation/fragmentation, as determined by cell permeabilization followed by DAPI staining and microscopy examination.

The activation of executive caspases was investigated using the Vybrant FAM Caspase-3 and 7 Kit (Invitrogen) including FLICA reagent that is retained within the cell, if bound to the active caspase molecule. Lymphoblasts from control and carriers of c.709-1G>A mutation were resuspended in 300 μ l of RPMI containing 10 μ l of FLICA reagent and incubated in 5% CO₂ at 37°C for 60 min. The cells were then washed with, and suspended in wash buffer provided with the kit. The samples were analyzed on the flow cytometer.

Analysis of Mitochondrial Membrane Potential

Changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Phi_m$) were analyzed by means of the fluorescent dye 5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1; Molecular Probes) as reported [42]. When live cells are incubated with JC-1, mitochondrial membrane polarization allows JC-1 to selectively enter mitochondria, which causes the reversible formation of JC-1 aggregates. JC-1 showed a spectral shift in emitted light from 530 nm (emission of JC-1 monomeric form; green) to 590 nm (emission of J-aggregate; green-orange) upon excitation at 488 nm. After 72 hours of serum deprivation control and PGRN deficient lymphoblasts were incubated with JC-1 at final concentration 5 mg/ml for 15 min at 37°C, in the dark. At the end of the incubation period, the cells were washed twice in cold PBS, resuspended in a total volume of 500 μ l, and analyzed by flow cytometry. The ratio of red/green fluorescence intensity was calculated before and after 72 h of serum deprivation. A decrease in this ratio indicates mitochondrial depolarization (i.e. loss of mitochondrial membrane potential).

References

- Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M (2010) TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 9: 995–1007.
- Cairns NJ, Perry RH, Jaros E, Burn D, McKeith IG, et al. (2003) Patients with a novel neurofilamentopathy: dementia with neurofilament inclusions. *Neurosci Lett* 341: 177–180.
- Cairns NJ, Bigio EH, Mackenzie IR, Neumann M, Lee VM, et al. (2007) Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta Neuropathol* 114: 5–22.
- Mackenzie IR, Baker M, Pickering-Brown S, Hsiung GY, Lindholm C, et al. (2006) The neuropathology of frontotemporal lobar degeneration caused by mutations in the progranulin gene. *Brain* 129: 3081–3090.
- Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, et al. (2006) Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 442: 916–919.
- Cruts M, Gijselink I, van der Zee J, Engelborghs S, Wils H, et al. (2006) Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* 442: 920–924.

Immunoblotting Analysis

50–100 μ g of protein from cell extracts were fractionated on a SDS polyacrylamide gel, and transferred to PVDF membrane (Bio-Rad). The amount of protein and the integrity of transfer were verified by staining with Ponceau-S solution (Sigma). The membranes were then blocked with non-fat milk and incubated, overnight at 4°C, with primary antibodies at the following dilutions: 1:500 anti-pRb, 1:1000 anti-CDK6, 1:500 anti-p130, 1:100 anti-cyclin D1, 1:200 anti-cyclin D2, 1:500 anti-cyclin D3, 1:200 anti-p16, 1:100 anti-p18, 1:5000 anti- β -actin, and 1:1000 anti-lamin B1. The release of cytochrome c from the mitochondria was assessed after cell fractionation to get cytosolic and crude mitochondrial extracts as described [43], using the Apo-Track™ cytochrome c antibody cocktail. Signals from the primary antibodies were amplified using species-specific antisera conjugated with horseradish peroxidase (Sigma) and detected with a chemiluminescent substrate detection system ELC (Amersham). The specificity of the antibodies was checked by omitting the corresponding primary antibody in the incubation medium. The relative protein levels were determined by scanning the bands with a GS-800 imaging densitometer provided with the Quantity One 4.3.1 software from BioRad, and normalized by those of β -actin.

Statistical Analysis

Unless otherwise stated, all data represent means \pm Standard Error of the Mean (SE). Statistical analysis was performed on the Data Desk package (version 4.0) for Macintosh. Statistical significance was estimated by analysis of variance (ANOVA) followed by the Fischer's LSD test for multiple comparisons. Differences were considered significant at a level of $p < 0.05$.

Acknowledgments

We would like to thank to all patients, their families and clinicians involved in this study.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CA AMR. Performed the experiments: CA NE. Contributed reagents/materials/analysis tools: AA MSA ALM FM. Wrote the paper: AMR. Recruited and diagnosed FTLD patients: FM ALM. Read and approved the final manuscript: CA NE AA FM MSA ALM AMR.

14. Guerra RR, Kriazhev L, Hernandez-Blazquez EJ, Bateman A (2007) Progranulin is a stress-response factor in fibroblasts subjected to hypoxia and acidosis. *Growth Factors* 25: 280–285.
15. Kamrava M, Simpkins F, Alejandro E, Michener C, Meltzer E, et al. (2005) Lysophosphatidic acid and endothelin-induced proliferation of ovarian cancer cell lines is mitigated by neutralization of granulin-epithelin precursor (GEP), a prosurvival factor for ovarian cancer. *Oncogene* 24: 7084–7093.
16. Zanocco-Marani T, Bateman A, Romano G, Valentini B, He ZH, et al. (1999) Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor. *Cancer Res* 59: 5331–5340.
17. Lopez de Munain A, Alzualde A, Gorostidi A, Otaegui D, Ruiz-Martinez J, et al. (2008) Mutations in progranulin gene: clinical, pathological, and ribonucleic acid expression findings. *Biol Psychiatry* 63: 946–952.
18. Moreno F, Indakoetxea B, Barandiaran M, Alzualde A, Gabilondo A, et al. (2009) "Frontotemporal" dementia: clinical phenotype associated with the c.709-1G>A PGRN mutation. *Neurology* 73: 1367–1374.
19. Alquezar C, Esteras N, Bartolome F, Merino JJ, Alzualde A, et al. (2012) Alteration in cell cycle-related proteins in lymphoblasts from carriers of the c.709-1G>A PGRN mutation associated with FTLT-DP dementia. *Neurobiol Aging* 33(2): 429.e7–20.
20. Mosch B, Morawski M, Mittag A, Lenz D, Tamok A, et al. (2007) Aneuploidy and DNA replication in the normal human brain and Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27: 6859–6867.
21. Park DS, Obeidat A, Giovanni A, Greene LA (2000) Cell cycle regulators in neuronal death evoked by excitotoxic stress: implications for neurodegeneration and its treatment. *Neurobiol Aging* 21: 771–781.
22. Husseman JW, Nochlin D, Vincent I (2000) Mitotic activation: a convergent mechanism for a cohort of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 21: 815–828.
23. Liu DX, Greene LA (2001) Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint. *Cell Tissue Res* 305: 217–228.
24. Ino H, Chiba T (2001) Cyclin-dependent kinase 4 and cyclin D1 are required for excitotoxin-induced neuronal cell death in vivo. *J Neurosci* 21: 6086–6094.
25. Osuga H, Osuga S, Wang F, Fetni R, Hogan MJ, et al. (2000) Cyclin-dependent kinases as a therapeutic target for stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10254–10259.
26. Brodski C, Vogt Weisenhorn DM, Dechant G (2002) Therapy of neurodegenerative diseases using neurotrophic factors: cell biological perspective. *Expert Rev Neurother* 2: 417–426.
27. Harguindey S, Reshkin SJ, Orive G, Arranz JL, Anitua E (2007) Growth and trophic factors, pH and the Na⁺/H⁺ exchanger in Alzheimer's disease, other neurodegenerative diseases and cancer: new therapeutic possibilities and potential dangers. *Curr Alzheimer Res* 4: 53–65.
28. DeKosky ST, Ikonomic MD, Wang X, Farlow M, Wisniewski S, et al. (2003) Plasma and cerebrospinal fluid alpha1-antichymotrypsin levels in Alzheimer's disease: correlation with cognitive impairment. *Ann Neurol* 53: 81–90.
29. Cova E, Cereda C, Galli A, Curti D, Finotti C, et al. (2006) Modified expression of Bcl-2 and SOD1 proteins in lymphocytes from sporadic ALS patients. *Neurosci Lett* 399: 186–190.
30. Stieler J, Grimes R, Weber D, Gartner W, Sabbagh M, et al. (2012) Multivariate analysis of differential lymphocyte cell cycle activity in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33: 234–241.
31. Uberti D, Lanni C, Carsana T, Francisconi S, Missale C, et al. (2006) Identification of a mutant-like conformation of p53 in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* 27: 1193–1201.
32. Bartolome F, de Las Cuevas N, Munoz U, Bermejo F, Martin-Requero A (2007) Impaired apoptosis in lymphoblasts from Alzheimer's disease patients: cross-talk of Ca2+/calmodulin and ERK1/2 signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* 64: 1437–1448.
33. Bialopiotrowicz E, Kuzniewska B, Kachamakova-Trojanowska N, Barcikowska M, Kuznicki J, et al. (2011) Cell cycle regulation distinguishes lymphocytes from sporadic and familial Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* 32: 2319 e2313–2326.
34. Nagy Z, Combrinck M, Budge M, McShane R (2002) Cell cycle kinesis in lymphocytes in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 317: 81–84.
35. Sala SG, Munoz U, Bartolome F, Bermejo F, Martin-Requero A (2008) HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin inhibits cell cycle progression at the G1/S checkpoint in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients independently of cholesterol-lowering effects. *J Pharmacol Exp Ther* 324: 352–359.
36. Munoz U, Bartolome F, Bermejo F, Martin-Requero A (2008) Enhanced proteasome-dependent degradation of the CDK inhibitor p27(kip1) in immortalized lymphocytes from Alzheimer's dementia patients. *Neurobiol Aging* 29: 1474–1484.
37. McKhann GM, Albert MS, Grossman M, Miller B, Dickson D, et al. (2001) Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Arch Neurol* 58: 1803–1809.
38. Ibarreta D, Urceley E, Parrilla R, Ayuso MS (1998) Distinct pH homeostatic features in lymphoblasts from Alzheimer's disease patients. *Ann Neurol* 44: 216–222.
39. Koistinen P (1987) Human peripheral blood and bone marrow cell separation using density gradient centrifugation on Lymphoprep and Percoll in haematological diseases. *Scand J Clin Lab Invest* 47: 709–714.
40. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, et al. (2002) Biologic sequelae of nuclear factor-kappaB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 99: 4079–4086.
41. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139: 271–279.
42. Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C (1993) A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun* 197: 40–45.
43. Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S (1999) Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J* 18: 2040–2048.
44. Ruffels J, Griffin M, Dickenson JM (2004) Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H2O2-induced cell death. *Eur J Pharmacol* 483: 163–173.
45. Koh G, Suh KS, Chon S, Oh S, Woo JT, et al. (2005) Elevated cAMP level attenuates 2-deoxy-d-ribose-induced oxidative damage in pancreatic beta-cells. *Arch Biochem Biophys* 438: 70–79.
46. Appert-Collin A, Hugel B, Levy R, Niederhoffer N, Coupin G, et al. (2006) Cyclin dependent kinase inhibitors prevent apoptosis of postmitotic mouse motoneurons. *Life Sci* 79: 484–490.
47. Hernandez-Ortega K, Quiroz-Baez R, Arias C (2011) Cell cycle reactivation in mature neurons: a link with brain plasticity, neuronal injury and neurodegenerative diseases? *Neurosci Bull* 27: 185–196.
48. Hoglinger GU, Breunig JJ, Depboylu C, Rouaux C, Michel PP, et al. (2007) The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3585–3590.
49. Li L, Cheung T, Chen J, Herrup K (2011) A comparative study of five mouse models of Alzheimer's disease: cell cycle events reveal new insights into neurons at risk for death. *Int J Alzheimers Dis* 2011: 171464. 171464 p.
50. Eckert A, Oster M, Zerfass R, Hennerici M, Muller WE (2001) Elevated levels of fragmented DNA nucleosomes in native and activated lymphocytes indicate an enhanced sensitivity to apoptosis in sporadic Alzheimer's disease. Specific differences to vascular dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 12: 98–105.
51. Naderi J, Lopez C, Pandey S (2006) Chronically increased oxidative stress in fibroblasts from Alzheimer's disease patients causes early senescence and renders resistance to apoptosis by oxidative stress. *Mech Ageing Dev* 127: 25–35.
52. Uberti D, Carsana T, Bernardi E, Rodella L, Grigoloto P, et al. (2002) Selective impairment of p53-mediated cell death in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *J Cell Sci* 115: 3131–3138.
53. Menu E, Garcia J, Huang X, Di Liberto M, Toogood PL, et al. (2008) A novel therapeutic combination using PD 0332991 and bortezomib: study in the 5T33MM myeloma model. *Cancer Res* 68: 5519–5523.
54. Gallinari P, Di Marco S, Jones P, Pallaro M, Steinkuhler C (2007) HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Res* 17: 195–211.
55. Greene LA, Liu DX, Troy CM, Biswas SC (2007) Cell cycle molecules define a pathway required for neuron death in development and disease. *Biochim Biophys Acta* 1772: 392–401.
56. Nguyen MD, Mushynski WE, Julien JP (2002) Cycling at the interface between neurodevelopment and neurodegeneration. *Cell Death Differ* 9: 1294–1306.
57. Herrup K, Neve R, Ackerman SL, Copani A (2004) Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death. *J Neurosci* 24: 9232–9239.
58. Langley B, Gensert JM, Beal MF, Ratan RR (2005) Remodeling chromatin and stress resistance in the central nervous system: histone deacetylase inhibitors as novel and broadly effective neuroprotective agents. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4: 41–50.
59. Jeong MR, Hashimoto R, Senatorov VV, Fujimaki K, Ren M, et al. (2003) Valproic acid, a mood stabilizer and anticonvulsant, protects rat cerebral cortical neurons from spontaneous cell death: a role of histone deacetylase inhibition. *FEBS Lett* 542: 74–78.
60. Kim HJ, Rowe M, Ren M, Hong JS, Chen PS, et al. (2007) Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. *J Pharmacol Exp Ther* 321: 892–901.
61. Kidd SK, Schneider JS (2010) Protection of dopaminergic cells from MPP+-mediated toxicity by histone deacetylase inhibition. *Brain Res* 1354: 172–178.
62. Ricobaraza A, Cuadrado-Tejedor M, Garcia-Osta A (2011) Long-term phenylbutyrate administration prevents memory deficits in Tg2576 mice by decreasing Abeta. *Front Biosci (Elite Ed)* 3: 1375–1384.
63. Ayala YM, Misteli T, Baralle FE (2008) TDP-43 regulates retinoblastoma protein phosphorylation through the repression of cyclin-dependent kinase 6 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3785–3789.
64. Dormann D, Capell A, Carlson AM, Shankaran SS, Rodde R, et al. (2009) Proteolytic processing of TAR DNA binding protein-43 by caspases produces C-terminal fragments with disease defining properties independent of progranulin. *J Neurochem* 110: 1082–1094.
65. Zhang YJ, Xu YF, Dickey CA, Buratti E, Baralle F, et al. (2007) Progranulin mediates caspase-dependent cleavage of TAR DNA binding protein-43. *J Neurosci* 27: 10530–10534.
66. Vassall KA, Stubbs HR, Primmer HA, Tong MS, Sullivan SM, et al. (2011) Decreased stability and increased formation of soluble aggregates by immature

- superoxide dismutase do not account for disease severity in ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 2210–2215.
67. Igaz LM, Kwong LK, Lee EB, Chen-Plotkin A, Swanson E, et al. (2011) Dysregulation of the ALS-associated gene TDP-43 leads to neuronal death and degeneration in mice. *J Clin Invest* 121: 726–738.
 68. Bossu P, Salani F, Alberici A, Archetti S, Bellelli G, et al. (2011) Loss of function mutations in the progranulin gene are related to pro-inflammatory cytokine dysregulation in frontotemporal lobar degeneration patients. *J Neuroinflammation* 8: 65.
 69. Rosen EY, Wexler EM, Versano R, Coppola G, Gao F, et al. (2011) Functional genomic analyses identify pathways dysregulated by progranulin deficiency, implicating Wnt signaling. *Neuron* 71: 1030–1042.
 70. Gladkevich A, Kauffman HF, Korf J (2004) Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28: 559–576.
 71. Capell A, Liebscher S, Fellerer K, Brouwers N, Willem M, et al. (2011) Rescue of progranulin deficiency associated with frontotemporal lobar degeneration by alkalinizing reagents and inhibition of vacuolar ATPase. *J Neurosci* 31: 1885–1894.
 72. Cenik B, Sephton CF, Dewey CM, Xian X, Wei S, et al. (2011) Suberoylanilide hydroxamic acid (vorinostat) up-regulates progranulin transcription: rational therapeutic approach to frontotemporal dementia. *J Biol Chem* 286: 16101–16108.

3

La haploinsuficiencia de PGRN aumenta la señalización de Wnt5a en células periféricas de individuos portadores de una mutación en *progranulina* asociada a la DLFT

Carolina Alquezar, Noemí Esteras, Ana de la Encarnación, Ainhoa Alzualde, Fermín Moreno, Adolfo López de Munain, Ángeles Martín-Requero.

“PGRN haploinsufficiency increased Wnt5a signaling in peripheral cells from FTLD-progranulin mutation carriers” *Neurobiol Aging* (2013) doi: 10.1016 [Epub ahead of print].

Resumen

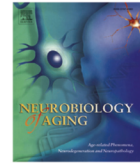
Resultados previos de nuestro laboratorio habían mostrado alteraciones en el control del ciclo celular en linfoblastos portadores de una mutación que produce haploinsuficiencia de PGRN (c.709-1G>A) asociada a la DLFT-TDP. En este trabajo se describe que el déficit de PGRN es capaz de activar la vía de señalización MAPK/ERK1/2 de manera dependiente de proteínas G α i, Ca²⁺ y de la actividad de la proteína quinasa C (PKC). El aumento de los niveles de PGRN, por la adición de PGRN exógena o de medio condicionado obtenido de las células control, normaliza la respuesta proliferativa de los linfoblastos deficientes en PGRN. Por otro lado, hemos detectado un aumento en los niveles de Wnt5a (intracelular y secretada) asociado con un aumento en la actividad de la calmodulina quinasa II (CaMKII), en los linfoblastos portadores de la mutación en GRN. El tratamiento de las células control con Wnt5a exógeno induce la activación de CaMKII, ERK1/2 y aumenta la actividad proliferativa de estas células hasta niveles similares a los encontrados en linfoblastos deficientes en PGRN. Finalmente, los resultados obtenidos con las líneas linfobásticas de portadores de la mutación c.709-1G>A se reprodujeron usando la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y en la que previamente se había silenciado el gen de la GRN. En conjunto, nuestros resultados desvelan un papel importante de la vía de señalización activada por Wnt5a en la DLFT-TDP y sugieren que podría ser una nueva diana terapéutica para el tratamiento de la enfermedad.



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Aging

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuaging



PGRN haploinsufficiency increased Wnt5a signaling in peripheral cells from frontotemporal lobar degeneration-progranulin mutation carriers

Carolina Alquézar^{a,f}, Noemí Esteras^a, Ana de la Encarnación^a, Ainhoa Alzualde^{b,e}, Fermín Moreno^{b,c,e}, Adolfo López de Munain^{b,c,d,e}, Ángeles Martín-Requero^{a,f,*}

^a Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain

^b Neuroscience Area-Institute Biodonostia, San Sebastián, Spain

^c Department of Neurology, Hospital Donostia, San Sebastián, Spain

^d Department of Neurosciences, University of Basque Country, San Sebastián, Spain

^e Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) de Enfermedades Neurodegenerativas

^f CIBER de Enfermedades Raras

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 January 2013

Received in revised form 11 June 2013

Accepted 13 September 2013

Keywords:

FTLD-TDP

Lymphocytes

Cell proliferation

CDK6

Wnt5a signaling

Pertussis toxin

ABSTRACT

Loss-of-function progranulin (*PGRN*) mutations have been identified as the major cause of frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 protein inclusions (FTLD-TDP). Previously, we reported cell cycle–related alterations in lymphoblasts from FTLD-TDP patients, carrying the c.709-1G>A null *PGRN* mutation, suggesting aberrant cell cycle activation in affected neurons. Here we report that *PGRN* haploinsufficiency activates the extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 pathway in a Ca^{2+} , protein kinase C–dependent, and pertussis toxin–sensitive manner. Addition of exogenous *PGRN* or conditioned medium from control cells normalized the response of *PGRN*-deficient lymphoblasts to serum activation. Our data indicated that noncanonical Wnt5a signaling might be overactivated by *PGRN* deficiency. We detected increased cellular and secreted levels of Wnt5a in *PGRN*-deficient lymphoblasts associated with enhanced phosphorylated calmodulin kinase II. Moreover, treatment of control cells with exogenous Wingless-type 5a (Wnt5a)-activated Ca^{2+} /calmodulin kinase II (CaMKII), increased extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 activity and cell proliferation up to the levels found in c.709-1G>A carrier cells. *PGRN* knockdown SH-SY5Y neuroblastoma cells also show enhanced Wnt5a content and signaling. Taken together, our results revealed an important role of Wnt signaling in FTLD-TDP pathology and suggest a novel target for therapeutic intervention.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Frontotemporal dementia (FTD) is the second most common cause of presenile dementia (Ratnavalli et al., 2002). At present, several genes have been associated with the frontotemporal lobar degeneration (FTLD) pathology, including *microtubule associated protein tau* (*MAPT*) gene, *progranulin* (*PGRN*), *valosin-containing protein-1* (*VCP*), *chromatin-modifying protein 2B* (*CHMP2B*) (Baker et al., 2006; Cruts et al., 2006; Holm et al., 2007; Rademakers et al., 2004; Watts et al., 2004) and, recently, the novel C9orf77 hexanucleotide expansion in chromosome 9 responsible for familial Frontotemporal dementia with Motorneuron Degeneration (FTD-MND) cases and amyotrophic lateral sclerosis (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011). The pathology of

FTD associated with *PGRN* mutations is characterized by ubiquitin-positive TDP-43 inclusions and absence of tau pathology and is thus named FTLD-TDP (Eriksen and Mackenzie, 2008; Neumann et al., 2006; Premi et al., 2012). *PGRN* mutations are dominantly inherited, and the disease mechanism is postulated to be haploinsufficiency because most *PGRN* mutations lead to an approximately 50% reduction in *PGRN* levels (Ahmed et al., 2007; Coppola et al., 2008; Cruts and Van Broeckhoven, 2008).

PGRN was first identified as a gene that was overexpressed in epithelial tumors and was further found to be a player in wound healing and inflammation (Zhu et al., 2002). The full-length human *PGRN* transcript encodes the *PGRN* precursor of 593 amino acids with a predicted molecular mass of 63.5 kDa. *PGRN* is secreted and cleaved by extracellular proteases like elastase, producing mature granulins (Zhu et al., 2002). Progranulin and granulins have been known to function as growth factors, exerting opposing effects on cell growth and neurite outgrowth (Van Damme et al., 2008). Nevertheless, the function of *PGRN* in the central nervous system is

* Corresponding author at: Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 837 3112; fax: +34 91 536 0432.
E-mail address: amrequero@cib.csic.es (Á. Martín-Requero).

poorly understood and sparsely studied (Neumann et al., 2009; Rohrer et al., 2009). Therefore, unraveling the function of PGRN in the central nervous system would be of great value in the development of disease-modifying therapies.

The involvement of cell cycle–related events in neurodegenerative disorders is becoming well recognized (Herrup and Yang, 2007; Hoglinger et al., 2007; Ueberham and Arendt, 2005). Post-mitotic neurons in the affected regions show aberrant induction of cell cycle regulators, which is believed to induce detrimental consequences for neurons (Bonda et al., 2010; Lee et al., 2011). Regarding FTLD, the presence of mitotic markers in the frontal cortex of 2 individuals diagnosed FTLD-17 from the Seattle BK family carrying the Val279Met tau mutation was previously reported (Hussemann et al., 2000). These authors also reported changes in cell cycle regulatory proteins in other FTLD-tau diseases such as corticobasal degeneration or Pick disease. More recently, the presence of phosphorylated retinoblastoma protein (pRb) has been detected in the brain of patients suffering from a number of tauopathies including FTD (Stone et al., 2011). In addition, a possible link between FTLD-TDP and altered cell cycle control was reported (Ayala et al., 2008). These authors described a loss of functional nuclear TDP-43 in cultured PGRN-deficient neurons, thereby decreasing its inhibitory transcriptional regulation of cyclin-dependent kinase 6 (CDK6), which plays a key role in G₁ progression (Weinberg, 1995).

Previous work in our laboratory attempted to unravel the molecular consequences of PGRN deficiency in the proliferative response of immortalized lymphocytes from carriers of a prevalent ancestral loss-of-function PGRN mutation related to Basque population (c.709-1G>A) (Lopez de Munain et al., 2008; Moreno et al., 2009). Enhanced proliferation of PGRN-deficient cells, associated with upregulation of CDK6, was shown compared with control cells (Alquezar et al., 2012b). Thus, it seems that in FTLD-TDP, as is the case for other neurodegenerative disorders, peripheral cells from patients may show a disease-specific signature (de las Cuevas et al., 2003; Stieler et al., 2012). In this work, we used lymphoblastoid cell lines obtained by infecting peripheral blood mononuclear cells with the Epstein-Barr virus (EBV). Previously, we demonstrated that EBV-immortalized lymphocytes retain the cellular response of fresh obtained lymphocytes, to serum addition or withdrawal, finding similar changes in cell proliferation and survival, as well as in the content of certain regulatory proteins to those found in untransformed lymphocytes (Bartolome et al., 2007; Munoz et al., 2008). Therefore, easily accessible blood cells from FTLD-TDP patients could be a useful model to study cell cycle–related events in FTLD-TDP pathology.

In this work, we analyzed potential alterations in signaling pathways induced by PGRN haploinsufficiency to explain the altered cellular response to serum stimulation. It is known that PGRN interacts, outside and inside the cell, with signaling transduction pathways to regulate a wide number of cellular functions. For example, PGRN can activate various growth factor signaling pathways involved in cell growth/survival, including extracellular regulated kinase (ERK), phosphatidyl inositol-3 kinase (PI3K)/Akt and p70S6 (He et al., 2002; Monami et al., 2006; Zanocco-Marani et al., 1999). More recently, it was reported that PGRN may be involved in Wnt signaling (Rosen et al., 2011). To address the influence of PGRN deficit in cell signaling, we use specific inhibitors of main pathways as well as conditioned medium from control and PGRN-deficient lymphoblasts or exogenous recombinant human PGRN (rhPGRN). Our results show that the specific signaling cascade implicated in the upregulation of CDK6 activity and cell proliferation of PGRN mutation bearing lymphoblasts is Ca²⁺, protein kinase C (PKC), and pertussis toxin (PTX)–dependent and involves activation of the ERK1/2 pathway. Evidence is presented that noncanonical Wnt5a may be overactivated in PGRN-deficient cells.

2. Method

2.1. Materials

All components for cell culture were obtained from Invitrogen (Barcelona, Spain). 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic tetrakis (acetoxymethylester) /BAPTA-AM, Genistein, GF109203X, PTX, SB202190, and KNethylen glycol tetraacetic acid (EGTA)-62 were obtained from Sigma Aldrich (Alcobendas, Spain). LY294002 and PD98059 were obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany). PGRN (human recombinant) was obtained from Enzo (Zandhoven, Belgium) and recombinant human/mouse Wnt5a was obtained from R&D Systems (Madrid, Spain). Antibodies used in this study are listed in Table 1. Polyvinylidene fluoride membranes were purchased from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). The enhanced chemiluminescence system was from Amersham (Uppsala, Sweden.). Other reagents were of molecular biology grade.

2.2. Cell lines

Twenty-nine individuals were enrolled in this study: 19 carriers of the c.709-1G>A PGRN gene mutation (7 of them patients of FTLD-TDP and 12 asymptomatic) and 10 control individuals without signs of neurologic degeneration. Asymptomatic and control individuals were relatives of patients. All patients were diagnosed as FTD in the Donostia Hospital using consensus criteria as published elsewhere (McKhann et al., 2001). Patients exhibited variable phenotype of initial symptoms. Four presented the behavioral variant of FTD, 1 progressive nonfluent aphasia and the other corticobasal basal syndrome. Patients developed a relatively rapidly progressive dementia with features that led to a secondary diagnosis. Notably, this secondary diagnosis was corticobasal basal syndrome in 3 of the behavioral-variant FTD cases.

The PGRN levels in plasma were strongly reduced in affected and unaffected subjects carrying the c.709-1G>A mutation (a range of 20–61 ng/mL compared with a range of 90–170 ng/mL in control individuals) (Alquezar et al., 2012a, 2012b).

All study protocols were approved by the Donostia Hospital and the Spanish Council of Higher Research Institutional Review Board and are in accordance with National and European Union Guidelines. In all cases, peripheral blood samples were taken after obtaining written informed consent from the patients or their relatives.

Table 1
Summary of antibodies used for Western blotting

Antibody name	Company	Dilution
β-actin (ACTBD1187)	Santa Cruz (sc-81178)	1:500
Phospho-Akt(Ser473)	Cell Signaling (#9271)	1:1000
Akt1 (C-20)	Santa Cruz (sc-1618)	1:1000
Phospho-CaMKII (Thr286)	Cell Signaling (#3361)	1:500
CaMKII	Cell Signaling (#3362)	1:500
Cdk6 (C-21)	Santa Cruz (sc-177)	1:1000
Anti-granulin (EPR3781)	Abcam (ab108608)	1:500
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) XP	Cell Signaling (#4370)	1:2000
p44/42 MAP Kinase	Cell Signaling (#9102)	1:2000
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP	Cell Signaling (#4511)	1:1000
p38 MAPK	Cell Signaling (#9212)	1:1000
Rb (C-15)	Santa Cruz (sc-50)	1:500
α-tubulin (B-5-1-2)	Santa Cruz (sc-23948)	1:1000
Anti-Wnt5a	Abcam (ab72583)	1:500

Key: CaMKII, Ca²⁺/CaM-dependent kinase II; ERK, extracellular-regulated kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; Wnt5a, Wingless-type 5a.

Table 2
Sequences of oligodeoxyribonucleotides primers used for quantitative real-time polymerase chain reaction

Gene	Primer sequence	
	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
FZD2	GGTGTGGTGGCTACAT	GAGAAGCGCTCGTTGCAC
FZD3	ACAGCAAAGTGAGCAGCTACC	CTGTAACGACAGGCGGTGA
FZD4	TTCACACCGCTCATCCAGTA	TGCACATTGGCACATAAACA
FZD5	TCTTCACGCTGCTCTACAG	GGTAGTGTGCTCGTACAGGT
β-ACTIN	CCAACGCGAGAAGATGA	CCAGAGCGGTACAGGGATAG

Probes were designed using the Universal ProbeLibrary form Human (Roche Applied Science).

Establishment of lymphoblastic cell lines was performed in our laboratory as previously described (Ibarreta et al., 1998) by infecting peripheral blood lymphocytes with EBV. Cells were grown in suspension in T flasks in an upright position, in

approximately 10 mL of RPMI-1640 medium that contained 2 mM L-glutamine, 100 µg/mL streptomycin/penicillin, and, unless otherwise stated, 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and maintained in a humidified 5% CO₂ incubator at 37 °C. Fluid was routinely changed every 2 days by removing the medium above the settled cells and replacing it with an equal volume of fresh medium. The cellular content of PGRN, determined by Western blotting, was 0.97 ± 0.024 for control individuals and 0.50 ± 0.021 and 0.48 ± 0.08 for c.709-1G>A PGRN mutation carriers (asymptomatic and FTLD-TDP patients, respectively; see Supplementary Fig. 1S).

2.3. PGRN knockdown neuroblastoma SH-SY5Y cell lines

Stable PGRN knockdown neuroblastoma SH-SY5Y cells (Clone #207) was a generous gift from Drs. Joselin and Wu from the Center for Genetic Medicine (Northwestern University, Chicago,

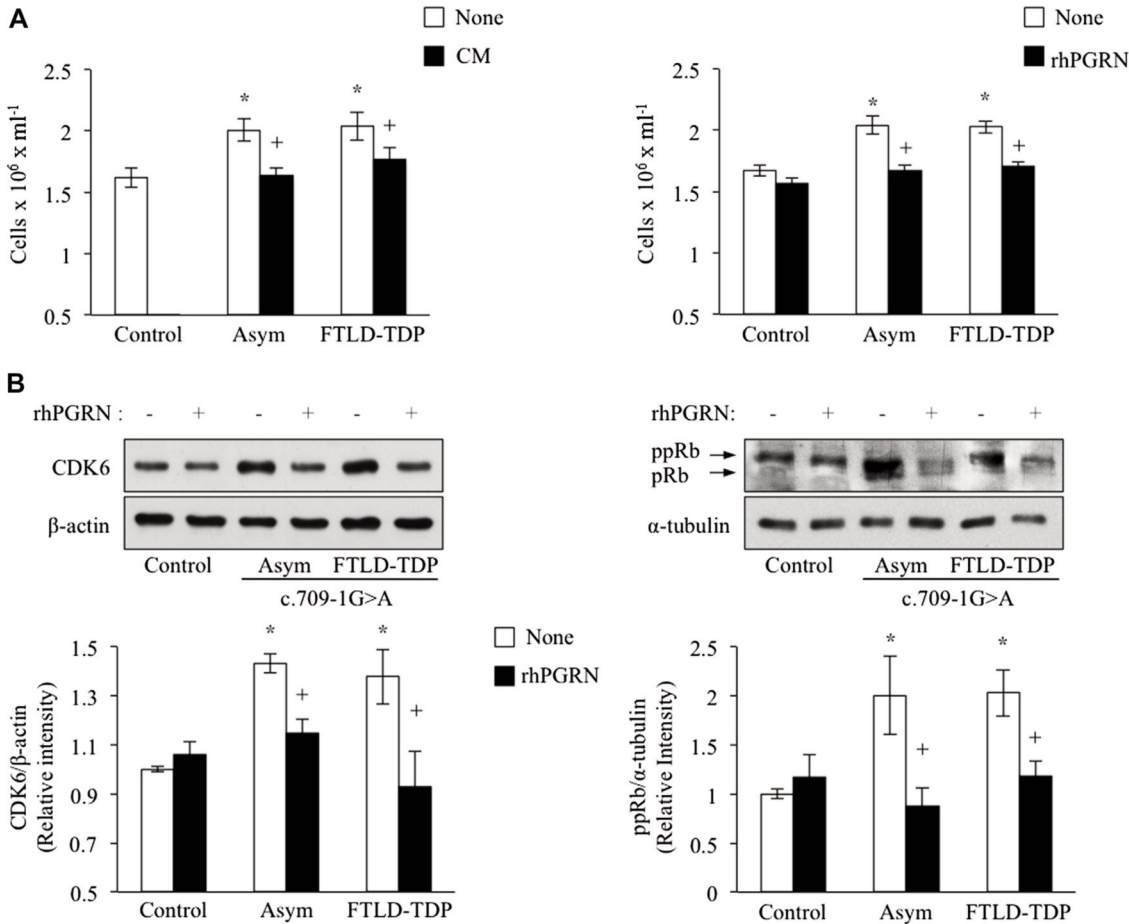


Fig. 1. Influence of progranulin (PGRN) levels on the proliferative activity of human lymphoblasts. (A) Immortalized lymphocytes from control and c.709-1G>A PGRN mutation carriers, and asymptomatic (Asym) or frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 protein inclusions (FTLD-TDP) patients were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$ and were incubated for 72 hours in the absence (white bars) or presence (black bars) of conditioned medium (CM) from control cells (left panel) or with 100 ng/mL of recombinant human (rh)PGRN (right panel). Cell proliferation was determined by counting the cells excluding Trypan blue using a TC10TM Automated Cell Counter. Values shown are the mean ± standard error of the mean (SEM) for 6 observations carried out with different cell lines from control and PGRN mutated carriers. * $p < 0.01$ significantly different from control cells; + $p < 0.01$ significantly different from untreated cells. (B) Representative immunoblots showing the effects of rhPGRN on Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) levels (left panel) and retinoblastoma protein (pRb) phosphorylation status (right panel). The densitometric data represent the mean ± SEM of 6 determinations.

IL, US). PGRN knockdown was achieved by using pSUPERIOR RNAi construct as previously described (Gao et al., 2010). The target sequence of 19 nucleotides targeted against nucleotides 207–226 (#207) of the human PGRN mRNA was designed. The 64 nt short hairpin RNA sense and antisense primer sequences were 5'-GATCCCCGGCCACTCCTGCATCTTTATTCAAGAGATAAAGATGCGAGGAGTGGCCCTTTTGGAAA-3' and 5'-AGCTTTTCCAAAAGGCCACTCCTGCATCTTTATCTCTGAATAAAGATGCAGAGTGGCCGGG-3'.

The sense and antisense primer pairs were annealed and ligated into the pSUPERIOR vector (OligoEngine, Seattle, WA, USA) according to manufacturer's instructions. The vector control was also stably introduced into SH-SY5Y cells to generate the control cell line.

2.4. Determination of cell proliferation

Cell proliferation was determined by total cell counting, using a TC10TM Automated Cell Counter from Bio-Rad Laboratories, S.A. (Madrid, Spain). EBV immortalized lymphocytes from control and PGRN mutation carriers were seeded at an initial cell concentration of 1×10^6 cells \times mL⁻¹. Cells were enumerated everyday thereafter. In some experiments, cell proliferation was assessed by the 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation method using an enzyme-linked immunoassay kit procured from Roche (Madrid, Spain). Cells (100,000 cells/well for lymphoblast and 15,000 cells/well for neuroblastoma SH-SY5Y cell lines) were seeded in 96-well microtiter plates. Four hours before the end of the interval of measurement, BrdU (10 μ M) was added. The cells were fixed with precooled 70% ethanol for 30 min at -20 °C and incubated with nucleases following manufacturer's recommendations. Cells were then treated for 30 minutes at 37 °C with peroxidase-conjugated anti-BrdU antibody. Excess antibody was removed by washing the cells 3 times, followed by the addition of substrate solution. Absorbance was measured at 405 nm with a reference wavelength of 492 nm using a microplate reader.

2.5. Cell cycle analysis

Exponentially growing cultures of cell lines were seeded at an initial concentration of 1×10^6 cells \times mL⁻¹. Cell cycle analysis was performed using a standard method (Krishan, 1975). Cells were fixed in 75% ethanol for 1 hour at room temperature. Subsequent centrifugation of the samples was followed by incubation of cells in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 mg/mL of RNase at room temperature for 20 minutes and staining with propidium iodide (PI; 25 μ g/mL). Cells were analyzed in an EPICS-XL cytometer (Coulter Científica, Móstoles, Spain). Estimates of cell cycle phase distributions were obtained by computer analysis of DNA content distributions.

2.6. Immunoblotting analysis

Cells were harvested, washed in PBS and then lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1% Nonidet P-40), containing 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1mM sodium pyrophosphate and protease inhibitor Complete Mini Mixture (Roche, Mannheim, Germany). Fifty to 100 μ g of protein from cell extracts were fractionated on a sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel and transferred to polyvinylidene fluoride membrane. The membranes were then blocked with 1% bovine serum albumin (Sigma) and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies as indicated in Table 1. Signals from the primary antibodies were amplified using species-specific antisera conjugated with

horseradish peroxidase (Bio-Rad) and detected with a chemiluminescent substrate detection system ELC. The specificity of the antibodies was checked by omitting the corresponding primary antibody in the incubation medium. Protein band densities were quantified using Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) after scanning the images with a GS-800 densitometer from Bio-Rad.

To detect secreted Wnt5a and PGRN proteins, lymphoblasts from control and c.709-1G>A carrier individuals were incubated in RPMI medium for 24 hours. The conditioned medium was harvested, centrifuged to remove the debris, and then concentrated using Amicon Ultra-15 10K centrifugal filter devices (Millipore, Madrid, Spain), treated with proteases inhibitors, phenylmethylsulfonyl fluoride and orthovanadate, and analyzed via Western blotting using antibodies against Wnt5a or PGRN.

2.7. Quantitative real-time polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from cell cultures using Trizol reagent (Invitrogen). RNA yields were quantified spectrophotometrically and RNA quality was checked by the A260/A280 ratio and on a 1.2% agarose gel to determine the integrity of 18S and 28S ribosomal RNA. RNA was then treated with DNase I Amplification Grade (Invitrogen). One microgram was reverse transcribed with the Superscript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen). Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed in triplicates using TaqMan Universal PCR MasterMix No Amperase UNG (Applied Biosystems) reagent according to the manufacturer's protocol. Primers were designed using the Universal ProbeLibrary for Human (Roche Applied Science) and used at a final concentration of 20 μ M. The sequences of the forward and reverse primers used are listed in Table 2. Real-time quantitative PCR was performed in the Bio-Rad iQ5 system using a thermal profile of an initial 5-minute melting step at 95 °C followed by 40 cycles at 95 °C for 10 seconds and 60 °C for 60 seconds. Relative messenger RNA (mRNA) levels of the genes of interest were normalized to β -actin expression using the simplified comparative threshold cycle delta CT method ($2^{-[\Delta\text{CTFZD} - \Delta\text{CT Actin}]}$).

2.8. Statistical analyses

Statistical analyses were performed on GraphPad Prism 5 for Macintosh (La Jolla, CA, USA). All the statistical data are presented

Table 3
Influence of calcium chelators, MAPK, and PI3K inhibitors on proliferation of control and c.709-1G>A carriers lymphoblasts

Cell treatment	% inhibition of cell growth		
	Control	Asymptomatic	FTLD Patients
EGTA (1 mM)	24 \pm 4	35 \pm 7	34 \pm 5
BAPTA (30 μ M)	0 \pm 6	31 \pm 4 ^a	34 \pm 5 ^a
Genistein (1 μ M)	37 \pm 4	33 \pm 3	28 \pm 4
GF109203X (50 nM)	4 \pm 4	32 \pm 8 ^a	29 \pm 6 ^a
PTX (0.2 ng/mL)	6 \pm 6	29 \pm 4 ^a	29 \pm 4 ^a
PTX+ GF109203X	8 \pm 4	30 \pm 6 ^a	35 \pm 2 ^a

Cells were seeded at an initial density of 1×10^6 /mL on day 0 and treated with the indicated concentrations of EGTA, BAPTA-AM, genistein, GF109203X, and pertussis toxin. BAPTA-AM was added to cells incubated in serum-free medium 30 min before replacing the medium by fresh RPMI medium containing 10% fetal bovine serum. To avoid toxicity in the incubations with EGTA or BAPTA-AM, cell proliferation was determined 24 hours after serum stimulation; otherwise proliferation was determined 72 hours after drug addition. Values shown are the mean \pm standard error of the mean for 7 observations. Key: BAPTA-AM, 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic tetrakis (acetoxymethylester)/BAPTA-AM; EGTA, ethylen glycol tetraacetic acid; PTX, pertussis toxin. ^a $p < 0.05$, significantly different from control cells.

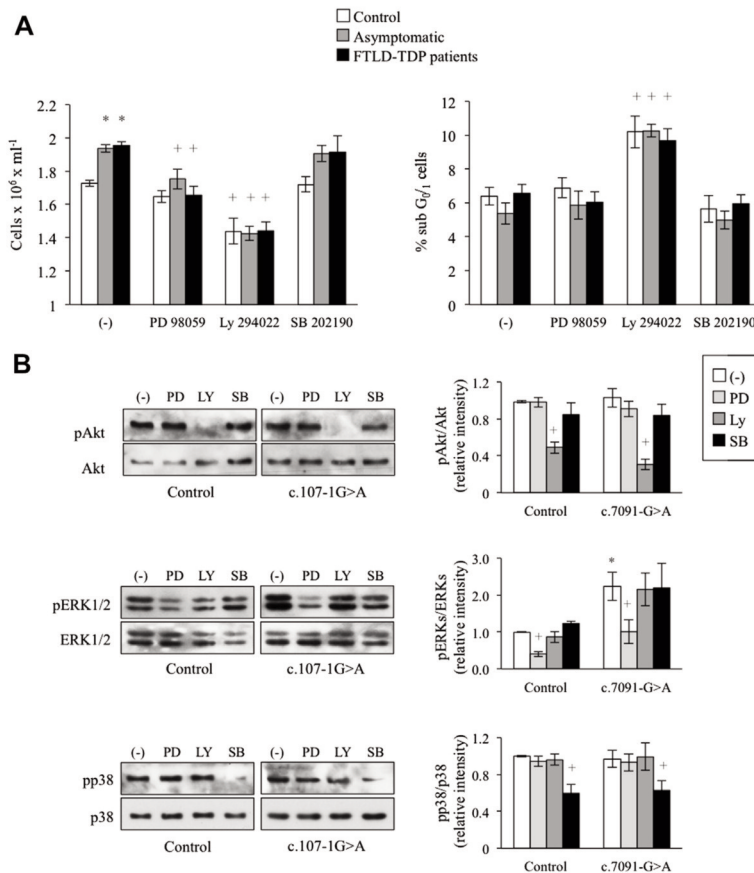


Fig. 2. Effects of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt and mitogen-activated protein kinases inhibitors on the serum-enhanced proliferation of progranulin (PGRN)-deficient lymphoblasts. (A) Immortalized lymphocytes from control and c.709-1G>A PGRN mutation carriers, asymptomatic or frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 protein inclusions (FTLD-TDP) patients, were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$ and were incubated for 72 hours in RPMI medium containing 10% fetal bovine serum, in the absence or in presence of 20 μM LY294022, 20 μM PD98059 or 10 μM SB202190. Aliquots were taken for cell counting (left panel) and for determination of the percentage of hypodiploid sub G₀/1 cells by flow cytometry (right panel). Data shown are the mean \pm standard error of the mean (SEM) of 7 determinations carried out with different cell lines. * $p < 0.01$ significantly different from control cells, + $p < 0.01$ significantly different from untreated cells. (B) Representative immunoblots from control and c.709-1G>A carriers individuals showing the effect of each of these drugs on its specific target 6 hours after their administration. The densitometric data represent the mean \pm SEM of 7 determinations, * $p < 0.05$ significantly different from control cells, + $p < 0.05$ significantly different from untreated cells.

as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical significance was estimated by analysis of variance followed by the Fischer's least significant difference test for multiple comparisons. Differences were considered significant at a level of $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Role of PGRN levels on the proliferative activity of lymphoblasts from control and c.709-1G>A PGRN mutation carrier individuals

Recent studies from our laboratory indicate that PGRN haploinsufficiency is causally associated to impaired response to serum stimulation (Alquézar et al., 2012b) or withdrawal (Alquézar et al., 2012a) of lymphoblasts bearing the loss-of-function PGRN mutation c.709-1G>A. Here we present data indicating that treatment of PGRN-deficient lymphoblasts with conditioned medium (CM) from control cells or exogenous recombinant human PGRN (rhPGRN) prevented the enhanced proliferation of these cell lines (Fig. 1A and B). It was previously reported that enhanced

proliferation of lymphoblasts derived from individuals carrying the c.709-1G>A PGRN mutation was the result of increased levels and activity of CDK6. Thus, we sought to evaluate whether exogenous PGRN was able to decrease the enhanced levels of CDK6. As shown in Fig. 1C and D, rhPGRN reduced the cellular content of CDK6, as well as the phosphorylation status of the pRb protein, an indirect measurement of CDK6 activity.

3.2. Signaling pathways involved in the serum-mediated stimulation of cell proliferation

To study the influence of PGRN deficiency on cell proliferation, we investigated the effects of perturbing receptors of different signaling pathways by using Ca²⁺ chelators, inhibitors of protein-kinases and PTX. The results of these experiments are summarized in Table 3. Extracellular and intracellular Ca²⁺ levels were reduced by EGTA and BAPTA-AM as described (Huang et al., 2010). The cell membrane-permeable BAPTA-AM (30 μM) was added to cells incubated in serum-free medium 30 min before

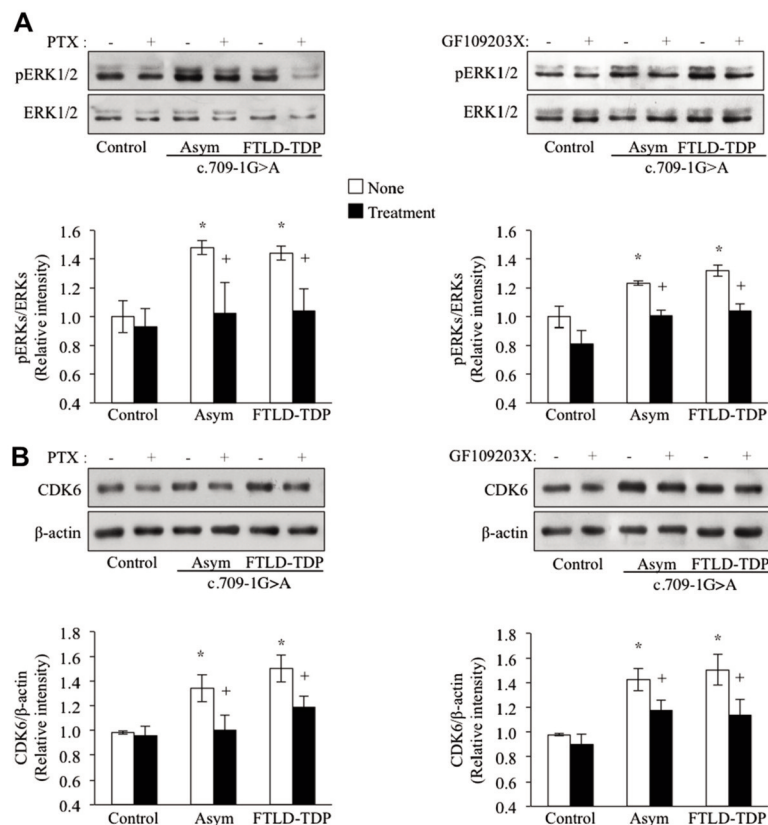


Fig. 3. Activation of extracellular regulated kinase (ERK)1/2 pathway in control and progranulin (PGRN)-deficient lymphoblasts. Effects of pertussis toxin (PTX) and GF109203X. (A) Effects of PTX (left panel) and GF109203X (right panel) on ERK1/2 activation after serum addition. Immortalized lymphocytes from control and c.709-1G>A PGRN mutation carriers or asymptomatic or frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 protein inclusions (FTLD-TDP) patients, were seeded at an initial density of 1×10^6 mL⁻¹ and were incubated in RPMI medium containing 10% fetal bovine serum in the absence (white bars) or in the presence of 0.2 ng/ml PTX or 50 nM GF109203X (black bars) and harvested 6 hours later for cell extracts preparation. (B) Effects of PTX or GF109203X on cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) levels in control and PGRN-deficient lymphoblasts. Representative immunoblots are shown. Densitometric measurements were performed on individual immunoblots and values indicate protein levels normalized to the corresponding β -actin levels \pm standard error of the mean for 6 experiments. * $p < 0.05$ significantly different from control cells, + $p < 0.05$ significantly different from untreated cells.

replacing the medium by fresh RPMI medium containing 10% FBS. For these experiments, cells were enumerated 24 hours after serum stimulation to avoid toxicity. Table 3 shows that EGTA significantly inhibited proliferation of control and PGRN-deficient cells; however, reducing the intracellular concentration of Ca²⁺ by BAPTA seems to inhibit selectively the serum-mediated enhanced proliferation of lymphoblast from c.709-1G>A PGRN mutation carriers. The average inhibition of cell proliferation, induced by the tyrosine kinase inhibitor, genistein, was similar in control and c.709-1G>A carrying cells (Table 3). Thus, although part of the serum-stimulated proliferation is exerted through activation of tyrosin kinase-dependent pathways, these results do not provide an explanation for the enhanced proliferation of c.709-1G>A carriers lymphoblasts. In contrast, treatment of cells with the PKC inhibitor GF109203X or PTX blocked the serum-induced enhanced proliferation of PGRN-deficient cells, without affecting significantly the proliferation rate of control cells, thus excluding potential toxic effects of these drugs at the dose used. Moreover, the cell cycle analysis by flow cytometry of control and PGRN-deficient cells following treatment with PTX or GF109203X did not reveal the presence of significant sub-G₀/G₁ hypodiploid

cells, characteristic of apoptosis/necrosis, in either control or PGRN mutated carriers cells (see Supplementary Fig. 2S). It was also observed that the percentage of PGRN-deficient cells that reached the S/G₂M phase is higher than that of control cells (Supplementary Fig. 2S). These results suggest that the blockade

Table 4
Relative FZD mRNA abundance

Gene	c.709-1G>A		
	Control	Asymptomatic	FTLD Patients
FZD2	0.6 \pm 0.2	0.4 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1
FZD3	0.7 \pm 0.2	0.6 \pm 0.2	0.8 \pm 0.5
FZD4	1.0 \pm 0.1	0.9 \pm 0.2	1.1 \pm 0.4
FZD5	0.9 \pm 0.1	0.9 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2

Immortalized lymphoblasts from control and c.709-1G>A individuals were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times$ mL⁻¹ and cultured for 24 hours in RPMI medium containing 10% fetal bovine serum. Cells were collected and subjected to quantitative real-time polymerase chain reaction. Relative mRNA levels of the FZD (2,3,4,5) genes were normalized to β -actin expression, and values for control cells were set as 1. Values shown are the mean \pm standard error of the mean for 4 cell lines. Key: FTLD, frontotemporal lobar degeneration; FZD, Frizzeld.

of the serum-induced increase in the cell number of PGRN-deficient cultures by PTX or GF109203X is due to inhibition of cell proliferation rather than the consequence of cytotoxic or apoptotic effects.

Two signaling cascades have emerged as major players in the process of proliferation in many cells: the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the PI3K pathways (Gerasimovskaya et al., 2005; Katso et al., 2001; Meloche and Pouyssegur, 2007). We tested the effects of SB202190, inhibitor of p38; PD98059, inhibitor of mitogen extracellular regulated kinase kinase 1/2 (MEK1/2), the upstream activator of ERK1/2, and LY294002 inhibitor of PI3K on the serum-induced proliferation of control and c.709-1G>A carriers. As shown in Fig. 2A (left panel), the inhibition of PI3K/Akt pathway decreased total cell number in cultures of lymphoblasts from control as well as from PGRN-deficient individuals, asymptomatic or FTLD patients. In contrast, treatment of cells with the p38 inhibitor had no consequence related to cell number. Interestingly, the specific inhibitor of ERK1/2 selectively blocked the serum-mediated enhancement of total cell number of PGRN-deficient lymphoblasts. The possible influence of these drugs on cell viability was analyzed by determining the percentage of hypodiploid sub G₀/1 cells by flow cytometry (Fig. 2A right panel; see also Supplementary Fig. 3S). It was observed a moderate increase in the percentage of hypodiploid cells in control and PGRN-deficient lymphoblasts in the presence of the PI3K/Akt inhibitor but not in the presence of PD98059 or SB202190. Thus, the lower total cell number in c.709-1G>A carrier cultures observed in the presence of the ERK1/2 inhibitor (Fig. 2A, left panel) must be the result of a truly anti-proliferative action. The effectiveness of these compounds as kinase

inhibitors was confirmed by reduced phosphorylation of the corresponding kinase (Fig. 2B). Together, these results indicate a specific perturbation of the ERK1/2 pathway in PGRN-deficient cells in a PKC-dependent and PTX-sensitive manner.

3.3. Role of ERK1/2 activation in cell proliferation

Next, we examined the effects of PTX and the inhibitor of PKC on the serum-induced ERK1/2 activation in control and PGRN-deficient lymphoblasts. ERK1/2 phosphorylation increased transiently, the maximum effects being 6 hours after serum addition and declined afterward (results not shown). The addition of serum activated the ERK1/2 pathway in both control and c.709-1G>A PGRN mutation carriers, although the response was enhanced in PGRN-deficient cells (Fig. 3A). The increase in the phosphorylated form of ERKs did not result from increased expression of ERKs because total ERKs levels were not altered (Fig. 3A). Preincubation of cells with PTX prevented the enhanced ERK1/2 stimulation of c.709-1G>A carrier lymphoblasts without affecting the phosphorylation of ERK in control cells (Fig. 3A, left panel). The PKC inhibitor GF109203X also prevented the serum-mediated ERK1/2 activation (Fig. 3A, right panel) in accordance with the fact that GF109203X and PTX did not have additive effects in inhibiting cell proliferation (Table 3).

We next sought to check whether PTX and GF109203X are able to block CDK6 levels and enzyme activity. To this end, cells were preincubated with the corresponding drug for 30 minutes before serum stimulation. Twenty-four hours later, cells were harvested by Western blotting the levels of CDK6.

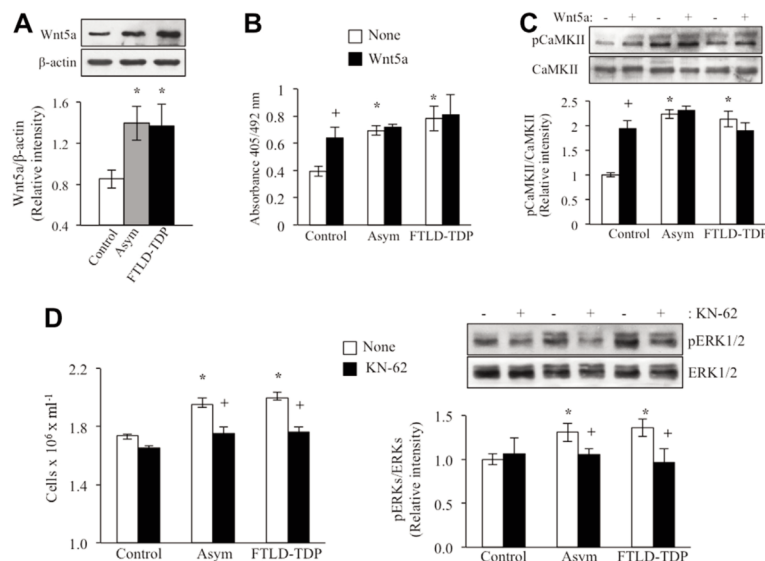


Fig. 4. Wingless-type 5a (Wnt5a) signaling is enhanced in c.709-1G>A progranulin (PGRN) mutation carriers. (A) Immortalized lymphocytes from control and c.709-1G>A PGRN mutation carriers, asymptomatic or frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 protein inclusions (FTLD-TDP) patients, were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{mL}^{-1}$ and incubated in RPMI medium 24 hours before cells were collected to prepare cell extracts for Western blotting. A representative blot is shown, and below the densitometric analyses represent the mean \pm standard error of the mean (SEM) of different observations carried out in 6 cell lines from each type. (B) Proliferative response of control and PGRN-deficient cells in the presence or in the absence of 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ recombinant human Wnt5a. One hundred thousand cells per well were seeded in 96-well plates; 24 hours later, cells were pulsed with 10 μM 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) for 4 hours. DNA synthesis was assessed by BrdU incorporation method according to the manufacturer's instructions. Proliferation was expressed as absorbance of stimulated minus that of nonstimulated cultures. Each bar represents the mean \pm SEM of 6 independent experiments performed in triplicate. (C) Effect of Wnt5a addition on Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) activity. Representative immunoblots showing phosphorylated and total CaMKII are presented. Densitometric analyses represent the mean \pm SEM of 6 determinations carried with different cell lines. (D) Effect of the treatment with KN-62 on proliferation (left panel) and in the activation of extracellular regulated kinase (ERK1/2) (right panel) in control and PGRN-deficient lymphoblasts. Cells were incubated during 72 hours in the absence or presence of 1 μM KN-62 for cell counting. Cell extracts to determine ERK1/2 activation were prepared 6 hours after drug administration. Data shown are the mean \pm SEM of the mean for 6 determinations carried out with different cell lines. * $p < 0.05$ significantly different from control cells, + $p < 0.05$ significantly different from untreated cells.

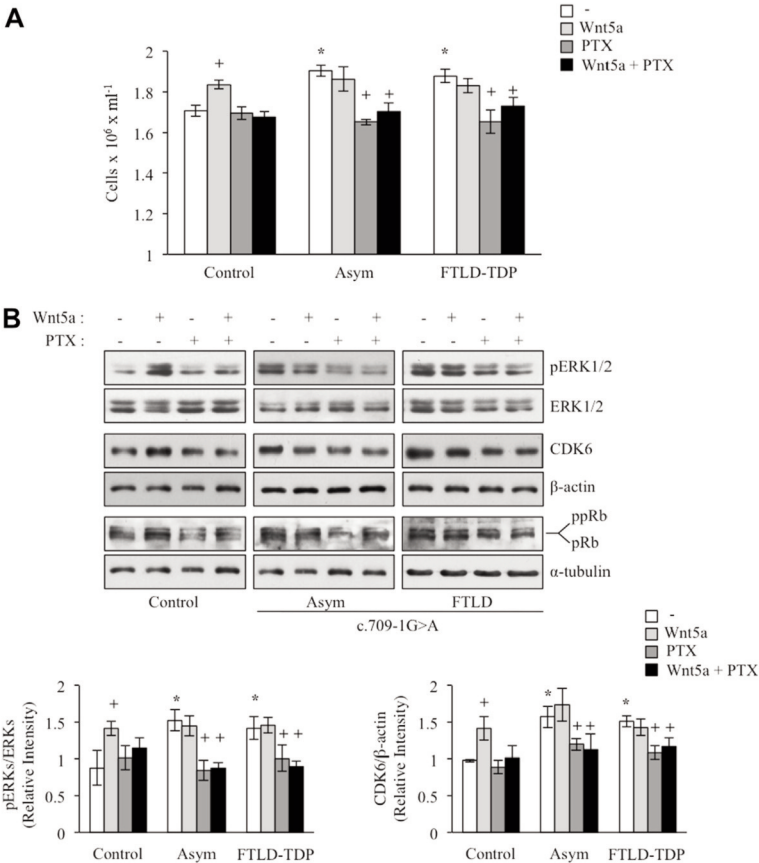


Fig. 5. Effects of exogenous Wingless-type 5a (Wnt5a) on cell proliferation, extracellular regulated kinase (ERK)1/2 activity, cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) levels and retinoblastoma protein (pRb) phosphorylation status. (A) Immortalized lymphocytes from control and c.709-1G>A *progranulin* (*PGRN*) mutation carriers or asymptomatic or frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 protein inclusions (FTLD-TDP) patients were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$ and were incubated for 72 hours in RPMI medium containing 10% fetal bovine serum in the absence or presence of 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Wnt5a, alone or in combination with 0.2 ng/mL of pertussis toxin (PTX). Values shown are the mean \pm standard error of the mean (SEM) for 6 determinations carried out with different cell lines. (B) For cell extracts, cells were harvested 6 hours after drug addition. Representative immunoblots show the effects of Wnt5a decreasing the ERK1/2 phosphorylation, CDK6 levels, and pRb phosphorylation in control cells in a PTX-dependent manner. Below the densitometric measurements of individual immunoblots for ERK1/2 and CDK6 proteins are shown, normalized to the corresponding total ERK1/2 or β -actin, respectively. Values shown are the mean \pm SEM for 6 experiments. * $p < 0.05$ significantly different from control cells, + $p < 0.05$ significantly different from untreated cells. Abbreviation: pp, the hyperphosphorylated form of pRb.

Fig. 3B shows how PTX (left panel) or GF109203X (right panel) treatments were effective in decreasing the content of CDK6 of lymphoblasts carrying the c.709-1G>A *PGRN* mutation up to levels similar to those of control cells.

3.4. Wnt signaling in *PGRN*-deficient lymphoblasts

Bearing in mind that a PTX-sensitive G-protein coupled receptors signaling pathway seems to be exacerbated in *PGRN*-deficient cells, we focused on the Wnt pathway based on a recent report that showed increased expression of Frizzled (FZD) receptors in a cell model of *PGRN* deficiency (Rosen et al., 2011). These authors performed weighted gene expression network analysis finding robust changes in expression of genes of the cell cycle and ubiquitination in *PGRN*-deficient neural stem cells in accordance with the human pathology, revealing an unexpected role of Wnt signaling pathway. The ligands for frizzled receptors are the Wnt family of glycosylated lipid-modified cysteine rich proteins (Janda et al., 2012). So far, at least 19 members of Wnt have been identified in mammals (Miller, 2002). It is known that

some members signal through the so-called canonical pathway involving β -catenin, whereas others, mainly the Wnt5a class, are independent of β -catenin (Huelsen and Birchmeier, 2001). Non-canonical signaling correlates with increased cytosolic Ca^{2+} levels and elevated CaMKII and PKC activities (Kikuchi et al., 2012; Kuhl et al., 2000). It also activates small and heterotrimeric G proteins (Niu et al., 2012). Interestingly, a recent report demonstrated that signaling through Wnt5a is PTX-sensitive (Kilander et al., 2011), indicating the involvement of a $G_{\alpha i}$ G-protein coupled receptors. On these grounds, we first determined the expression levels of some FZD receptors in control and *PGRN* mutation carrier lymphoblasts. By using real-time quantitative PCR, we found that lymphoblastoid cells express FZD2, FZD3, FZD4, and FZD5 receptors, with the FZD4 and FZD5 mRNA the more abundant transcripts. We did not find differences in the expression levels of any of these receptors between control and *PGRN*-deficient cells (Table 4). In contrast, we found increased cellular Wnt5a protein levels in lymphoblasts from asymptomatic and FTLD-TDP patients compared with those of control cells (Fig. 4A). The basal and Wnt5a-induced activation of cell proliferation, assessed by the rate

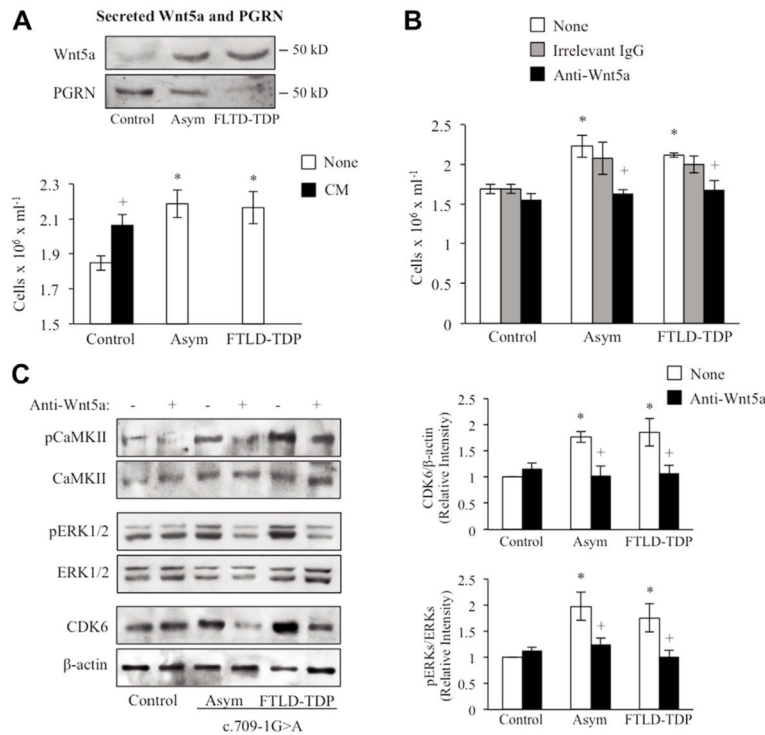


Fig. 6. Influence of Wingless-type 5a (Wnt5a) signaling activity in the proliferative response of lymphoblasts from control or c.709-1G>A *progranulin* (PGRN) mutation carriers. (A) Immortalized lymphocytes from control and c.709-1G>A PGRN mutation carriers were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{mL}^{-1}$. Control cells were incubated for 72 hours in conditioned medium (CM) from PGRN-deficient lymphoblasts. Representative immunoblots for secreted levels of Wnt5a and PGRN in the CM from PGRN-deficient cells are shown. Below the proliferative activity of control cells incubated in the presence of CM is shown. For comparison, proliferation of lymphoblasts from asymptomatic or frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 protein inclusions (FTLD-TDP) patients is shown. Cell proliferation was determined by cell counting. Values shown are the mean \pm standard error of the mean (SEM) for 6 observations carried out with different cell lines from control and PGRN mutated carriers. (B) Effects of a neutralizing antibody against Wnt5a in cell proliferation. Lymphoblasts from control and c.709-1G>A PGRN mutation carriers individuals were incubated in the absence or in the presence of 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of anti-Wnt5a antibody. Aliquots were taken 72 hours later for cell counting. Values shown are the mean \pm SEM of 4 determinations carried out with different cell lines. (C) Effects of anti-Wnt5a antibody on signaling through the Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II (CaMKII)/extracellular regulated kinase (ERK)1/2/cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) pathway. Representative immunoblots showing the effects of anti-Wnt5a antibody in the phosphorylation status of CaMKII and ERK1/2, and CDK6 levels are shown in the left panel; densitometric analyses are presented in the right panel. Values shown are the mean \pm SEM for 6 experiments. * $p < 0.05$ significantly different from control cell, + $p < 0.05$ significantly different from untreated cells.

of BrdU incorporation into DNA, is presented in Fig. 4B. It is shown that exogenous Wnt5a selectively increased the proliferative activity of control lymphoblasts up to the level found in PGRN-deficient cells, which express higher levels of Wnt5a (Fig. 4B). As shown in Fig. 4C, the lymphoblasts bearing the c.709-1G>A PGRN mutation display enhanced basal CaMKII activation, as monitored by increased basal levels of phospho-CaMKII. The treatment of cells with exogenous Wnt5a increased the CaMKII activity in control cells without affecting the phosphorylation status of CaMKII of PGRN-deficient lymphoblasts (Fig. 4C). These results suggest that increased Wnt5a/ Ca^{2+} signaling might be involved in regulating enhanced proliferation in peripheral cells from FTLD patients. Supporting this possibility is the fact that increased proliferation of PGRN-deficient lymphoblasts was prevented by chelating intracellular Ca^{2+} (Table 3). Moreover, using KN-62, a specific inhibitor of the Wnt5a/ Ca^{2+} pathway downstream mediator CaMKII also significantly reduced cell proliferation (Fig. 4D, left panel) and ERK1/2 activity (Fig. 4D, right panel) of PGRN-deficient lymphoblasts.

We next evaluated the dependence of Wnt5a-induced stimulation of proliferation on the activation of the $G_{\alpha i}$ /ERK1/2/CDK6 signaling pathway. To this end, we determined whether the endogenous and Wnt5a-induced enhanced cell proliferation was

sensitive to PTX treatment. As shown in Fig. 5A, the effect of exogenous Wnt5a on proliferation of control lymphoblasts was abrogated in the presence of PTX. Moreover, PTX was also effective in preventing the increased proliferation of lymphoblasts carrying the PGRN c.709-1G>A mutation (Fig. 5A). In Fig. 5B, it is shown that exogenous Wnt5a increased ERK1/2 activity and elevated CDK6 levels and the phosphorylation of the pRb protein in control cells in a PTX-sensitive manner.

Two experimental approaches were used to confirm that increased Wnt5a signaling is responsible for the enhanced proliferation of lymphoblasts bearing the c.709-1G>A PGRN mutation. First, we measured the levels of secreted Wnt5a and PGRN, observing significant reciprocal changes in the levels of these proteins in CM from PGRN-deficient cells and studied the effect of this CM on proliferation of control lymphoblasts. Second, we treated control and c.709-1G>A PGRN mutation bearing lymphoblasts with a neutralizing antibody against Wnt5a or with an irrelevant immunoglobulin. Fig. 6A shows that the CM from PGRN-deficient cells mimicked the effect of exogenous Wnt5a increasing proliferation of control cells reaching values similar to those found in lymphoblasts bearing the PGRN mutation. In contrast, the addition of anti-Wnt5a antibody to PGRN-deficient cells abrogated the serum-enhanced cell proliferation of these cell lines (Fig. 6B).

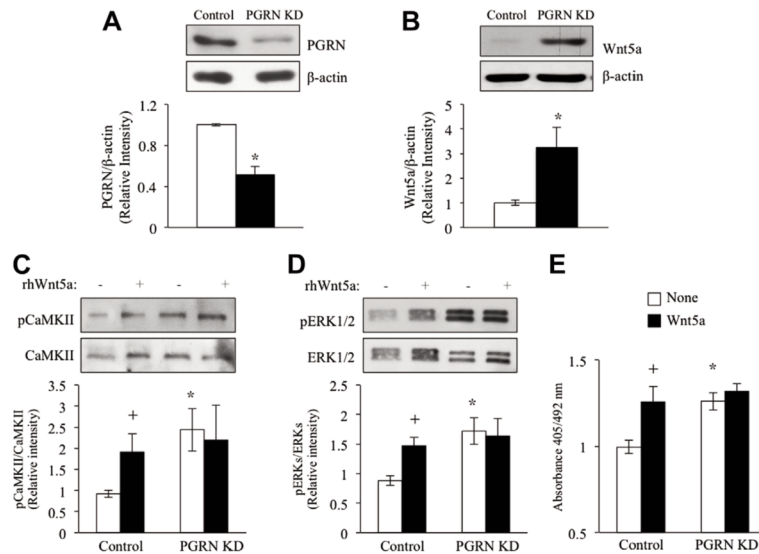


Fig. 7. Progranulin (PGRN) deficiency and Wingless-type 5a (Wnt5a) signaling in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. (A and B) Whole-cell extracts of SH-SY5Y clones expressing either the control vector or a target sequence of human *PGRN* mRNA, were analyzed for the expression of PGRN and Wnt5a by Western blotting using specific antibodies. β-actin levels were analyzed as loading controls. Values shown for the densitometric analyses are the mean ± standard error of the mean (SEM) for 4 experiments. * $p < 0.05$ significantly different from control cells. (C and D) Effect of the treatment with exogenous Wnt5a in the activation of Phospho-Ca²⁺/Calmodulin-dependent Kinase II (pCaMKII) and extracellular regulated kinase (ERK)1/2, respectively, in control and *PGRN* knockdown cells. Cell extracts were prepared 6 hours after drug administration (0.1 μg/mL). Data shown are the mean ± SEM for 4 experiments. * $p < 0.05$ significantly different from control cells. (E) Proliferative response of control and *PGRN* knockdown cells in the presence or in the absence of recombinant human Wnt5a. Fifteen thousand cells per well were seeded in 96-well plates; 24 hours later, cells were pulsed with 10 μM 5-bromo-2'-deoxyuridine for 4 hours. DNA synthesis was assessed by 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation method according to the manufacturer's instructions. Proliferation was expressed as absorbance of stimulated minus that of nonstimulated cultures. Data shown are the mean ± SEM for four determinations carried out with different cell lines. * $p < 0.05$ significantly different from control cells, + $p < 0.05$ significantly different from untreated cells.

The anti-Wnt5a antibody was also able to blunt the enhanced Wnt5a signaling in *PGRN*-deficient lymphoblasts because it decreased the levels of pCaMKII, pERK1/2, and CDK6 (Fig. 6C). Taken together, these results indicate that *PGRN* haploinsufficiency is associated with enhanced levels and signaling of Wnt5a.

3.5. *PGRN* deficiency and Wnt5a signaling in human neuroblastoma SH-SY5Y cells

We addressed the issue as to whether *PGRN* deficiency would have an impact on Wnt5a signaling in neuronal cells. We used *PGRN* knockdown human neuroblastoma SH-SY5Y cells to determine the cellular levels of Wnt5a protein and to analyze the effect of reduced *PGRN* on Wnt5a signaling. As expected, these cells displayed lower levels of PGRN (Fig. 7A). In parallel, we observed increased cellular content of Wnt5a protein (Fig. 7B). *PGRN* deficiency seems to activate the Wnt5a signaling pathway in neuroblastoma SH-SY5Y cells, as indicated by higher basal levels of pCaMKII and ERK1/2 compared with those of control cells (Fig. 7C and 7D). Treatment of control cells with exogenous Wnt5a protein induced the activation of these 2 enzymes to levels similar to those of *PGRN* KD SH-SY5Y cells (Fig. 7C and 7D). Moreover, both increasing endogenous or exogenous Wnt5a levels resulted in enhanced incorporation of BrdU into DNA in SH-SY5Y neuroblastoma cells (Fig. 7E).

4. Discussion

Mounting evidence suggests that aberrant cell cycle activation in postmitotic neurons contributes to neuronal pathology and neurodegeneration (Bonda et al., 2010; Wishart et al., 2006). It has

been proposed that aberrant reactivation of cell cycle might render a higher vulnerability of neurons to other detrimental insults according to the so-called 2-hit hypothesis (Zhu et al., 2004). We previously addressed the issue as to whether *PGRN* deficiency impairs the control of cell cycle by performing comparative analysis of the proliferative activity and cell survival and cell death mechanisms in immortalized lymphocytes from control and individuals with a null *PGRN* mutation (c.709-1G>A) either asymptomatic or diagnosed of FTLD-TDP (Alquézar et al., 2012a, 2012b). We reported neoplastic-like features of lymphoblasts from FTLD-TDP patients associated with increased levels and activity of CDK6 (Alquézar et al., 2012b). Here we studied the underlying signaling pathways involved in the enhanced serum-mediated proliferative response of *PGRN*-deficient cells. Our results suggest that noncanonical Wnt5a signaling could be overactivated by *PGRN* haploinsufficiency. This finding is in line with a recent report in which a genome-wide analysis of Wnt regulated transcriptional network indicated that Wnt and *PGRN* reciprocally regulate each other, therefore providing a connection between Wnt signaling and FTLD-TDP pathology (Wexler et al., 2011). The data herein suggest that Wnt5a signaling could be aberrantly activated in lymphoblasts bearing the *PGRN* mutation c.709-1G>A. Several lines of evidence support this possibility: (1) addition of exogenous Wnt5a to control lymphoblasts enhanced the proliferative activity up to the levels found in *PGRN*-deficient cells; (2) exogenous Wnt5a was effective in increasing CDK6 levels in control cells; (3) conditioned medium from *PGRN*-deficient cells showed enhanced levels of Wnt5a; (4) addition of conditioned medium from *PGRN*-deficient cells increased proliferation of control cells; and (5) blocking Wnt activation in *PGRN*-deficient cells with an antibody against Wnt5a normalized the proliferative activity of *PGRN*-deficient cells.

PGRN HAPLOINSUFFICIENCY

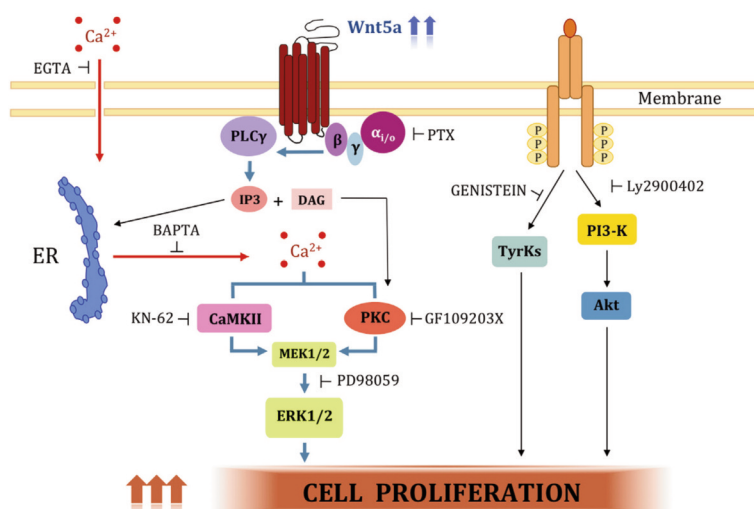


Fig. 8. Diagram summarizing the influence of progranulin (PGRN) haploinsufficiency in increasing noncanonical Wingless-type 5a (Wnt5a) signaling, Ca^{2+} , and Protein Kinase C (PKC)-dependent pertussis toxin (PTX)-sensitive leading to enhanced cell proliferation. Progranulin (PGRN)-deficient cells appear to secrete increased levels of Wnt5a. The binding of Wnt5a to a $\text{G}_{\alpha i/o}$ protein coupled receptor activates the release of Ca^{2+} from intracellular stores, which in turn stimulates Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Kinase II (CaMKII) and PKC, upstream modulators of extracellular regulated kinase (ERK)1/2 pathway and cell proliferation. Treatment of lymphoblasts bearing the c.709-1G>A PGRN mutation with the ERK1/2 inhibitor PD98059 prevented the serum-mediated enhancement of cell proliferation. Abbreviations: ER, Endoplasmic reticulum; PI3-K Phosphatidylinositol-3 Kinase; PLC, Phospholipase C; MEK1/2, Mitogen Extracellular regulated Kinase Kinase 1/2; TyrKs, Tyrosin Kinases

The role of Wnt5a on cell proliferation is complex. Wnt5a has been found to promote the proliferation of human glioblastoma (Yu et al., 2007), lung fibroblasts (Vuga et al., 2009), and B-cell lymphopoiesis in bone marrow cell culture (Malhotra et al., 2008), but to suppress the proliferation of B cells in Wnt5a KO mice (Liang et al., 2003). On the basis of these studies, the effects of Wnt5a on cell proliferation seem to depend on cell type. We report here a pro-proliferative action of exogenous Wnt5a in control lymphoblasts, as well as enhanced proliferative activity in PGRN mutant cells compared with control cells. Increased cellular and secreted levels of Wnt5a were found in lymphoblasts derived from individuals harboring the c.709-1G>A PGRN mutation regardless of the clinical status thus suggesting that the increased Wnt5a signaling is probably an early etiologically relevant event during FTLD-TDP development.

Our data indicate that Wnt5a signals through a $\text{G}_{\alpha i}$ -PLC-PKC-ERK1/2 cascade. The increased cell proliferation observed in PGRN-deficient cells is abrogated in the presence of PTX. Moreover the effects of exogenous Wnt5a in control cells are also sensitive to PTX inhibition. This observation is in accordance with previous reports indicating that Wnt5a stimulation involves activation of heterotrimeric $\text{G}_{\alpha i}$ proteins in mammalian cells (Kilander et al., 2011; Wilson et al., 2010). PGRN deficiency is accompanied by enhanced stimulation of the ERK1/2 pathway, most likely through the noncanonical activation of Wnt5a as indicated by the observed increased levels of pCaMKII and evidence of PKC activation in lymphoblasts from c.709-1G>A PGRN mutation carriers. Moreover, inhibition of these 2 kinases by the specific inhibitors KN-62 and GF109203X, respectively, resulted in the abrogation of the enhanced proliferative response of PGRN-deficient cells. The proposed scenario is represented schematically in Fig. 8. $\text{G}_{\alpha i}$ protein-dependent Wnt5a signaling to ERK1/2-mediated increased proliferation had been previously

described in microglia cells (Halleskog et al., 2012). The molecular mechanism through which ERK1/2 regulates the expression levels and kinase activity of CDK6 in PGRN-deficient lymphoblasts cannot be ascertained by the present results. The expression of CDK6 is negatively regulated by TDP-43 (Ayala et al., 2008). Several reports indicate that PGRN deficiency induced mislocalization of TDP-43 protein, leading to a loss of the DNA-RNA binding function of the protein (Dormann et al., 2009; Zhang et al., 2007). Indeed an increase in the cytosolic content of TDP-43 protein could be observed in c.709-1G>A bearing lymphoblasts associated with increased levels of CDK6 (Alquezar et al., 2012b). Recently, the ERK1/2 pathway has been found to play an important role in TDP-43 nuclear clearance and cytoplasmic accumulation of the protein in a cell model of induced stress in neurons and in Hela cells (Parker et al., 2012). Thus it is tempting to speculate that ERK1/2-mediated increased CDK6 expression levels and cell proliferation in PGRN-deficient cells could be the result of enhanced exit of TDP-43 from the nucleus.

In summary, we provided evidence that PGRN haploinsufficiency aberrantly increased noncanonical, $\text{G}_{\alpha i}$ dependent-Wnt signaling, leading to activation of ERK1/2-mediated stimulation of proliferation of lymphoblasts derived from individuals bearing a FTLD-associated PGRN mutation.

Although FTLD-TDP-associated changes detected in peripheral cells might not fully reflect those in FTLD-TDP brain, it is evident that in addition to neuronal damage, there are also peripheral aspects of the disease. A close relationship seems to exist between the state of the immune system, particularly lymphocytes, and some psychiatric disorders including Alzheimer's disease (AD) (Gladkevich et al., 2004). Recent work has indicated a possible role of activation of the noncanonical Wnt pathway in AD pathogenesis by orchestrating the neuro-inflammatory response (Li et al., 2011). Our results show that

Wnt5a signaling is also enhanced in human neuroblastoma SH-SY5Y after silencing of the PGRN gene. Thus, it is possible that a mechanism involving neuroinflammatory cytokines that link the peripheral immune and nervous systems could influence neuronal survival in FTLD-TDP. Aberrant activation of Wnt signaling is associated with several neurodegenerative disorders including Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and Parkinson's disease (Chen et al., 2012; da Cruz e Silva et al., 2010; Inestrosa and Arenas, 2010; L'Episcopo et al., 2012). Assuming that the PGRN deficiency and Wnt5a-mediated cell cycle disturbances reported here could be peripheral signs of the disease, our results suggest that modulators of Wnt signaling may play a critical role in the pathogenesis of FTLD-TDP, and therefore Wnt5a signaling could be an important target for developing novel therapies.

Disclosure statement

The authors have no actual or potential conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Ministerio de Economía y Competitividad (grant SAF2011-28603) and Fundación Ramón Areces to AM-R. Dr López de Munain received research support from the Basque Government, Spain (grant SAIO11.PR11BN002). We thank Drs Joselin and Wu for providing the PGRN KD SH-SY5Y cells. We thank the patients, their families, and the clinicians involved in this study.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.021>.

References

Ahmed, Z., Mackenzie, I.R., Hutton, M.L., Dickson, D.W., 2007. Progranulin in frontotemporal lobar degeneration and neuroinflammation. *J. Neuroinflamm.* 4, 7. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-4-7>.

Alquézar, C., Esteras, N., Alzualde, A., Moreno, F., Ayuso, M.S., Lopez de Munain, A., Martin-Requero, A., 2012a. Inactivation of CDK/pRb pathway normalizes survival pattern of lymphoblasts expressing the FTLD-progranulin mutation c.709-1G>A. *PLoS One* 7, e37057. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0037057>.

Alquézar, C., Esteras, N., Bartolome, F., Merino, J.J., Alzualde, A., Munain, A.L., Martin-Requero, A., 2012b. Alteration in cell cycle-related proteins in lymphoblasts from carriers of the c.709-1G>A PGRN mutation associated with FTLD-TDP dementia. *Neurobiol. Aging* 33, 429.e7–429.e20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.11.020>.

Ayala, Y.M., Misteli, T., Baralle, F.E., 2008. TDP-43 regulates retinoblastoma protein phosphorylation through the repression of cyclin-dependent kinase 6 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 3785–3789. doi:0800546105 [pii]10.1073/pnas.0800546105 [doi].

Baker, M., Mackenzie, I.R., Pickering-Brown, S.M., Gass, J., Rademakers, R., Lindholm, C., Snowden, J., Adamson, J., Sadovnick, A.D., Rollinson, S., Cannon, A., Dwosh, E., Neary, D., Melquist, S., Richardson, A., Dickson, D., Berger, Z., Eriksen, J., Robinson, T., Zehr, C., Dickey, C.A., Crook, R., McGowan, E., Mann, D., Boeve, B., Feldman, H., Hutton, M., 2006. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 442, 916–919. doi:nature05016 [pii]10.1038/nature05016 [doi].

Bartolome, F., de Las Cuevas, N., Munoz, U., Bermejo, F., Martin-Requero, A., 2007. Impaired apoptosis in lymphoblasts from Alzheimer's disease patients: cross-talk of Ca²⁺/calmodulin and ERK1/2 signaling pathways. *Cell. Mol. Life. Sci.* 64, 1437–1448.

Bonda, D.J., Lee, H.P., Kudo, W., Zhu, X., Smith, M.A., Lee, H.G., 2010. Pathological implications of cell cycle re-entry in Alzheimer disease. *Expert Rev. Mol. Med.* 12, e19. <http://dx.doi.org/10.1017/s146239941000150x>.

Chen, Y., Guan, Y., Zhang, Z., Liu, H., Wang, S., Yu, L., Wu, X., Wang, X., 2012. Wnt signaling pathway is involved in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis in adult transgenic mice. *Neurol. Res.* 34, 390–399. <http://dx.doi.org/10.1179/1743132812y.0000000027>.

Coppola, G., Karydas, A., Rademakers, R., Wang, Q., Baker, M., Hutton, M., Miller, B.L., Geschwind, D.H., 2008. Gene expression study on peripheral blood identifies progranulin mutations. *Ann. Neurol.* 64, 92–96. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.21397>.

Cruts, M., Gijssels, I., van der Zee, J., Engelborghs, S., Wils, H., Pirici, D., Rademakers, R., Vandenbergh, R., Dermaut, B., Martin, J.J., van Duijn, C., Peeters, K., Sciot, R., Santens, P., De Pooter, T., Mattheijssens, M., Van den Broeck, M., Cuijt, I., Vennekens, K., De Deyn, P.P., Kumar-Singh, S., Van Broeckhoven, C., 2006. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* 442, 920–924. doi:nature05017 [pii]10.1038/nature05017 [doi].

Cruts, M., Van Broeckhoven, C., 2008. Loss of progranulin function in frontotemporal lobar degeneration. *Trends Genet.* 24, 186–194. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2008.01.004>.

da Cruz e Silva, O.A., Henriques, A.G., Domingues, S.C., da Cruz e Silva, E.F., 2010. Wnt signalling is a relevant pathway contributing to amyloid beta-peptide-mediated neuropathology in Alzheimer's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9, 720–726.

de las Cuevas, N., Urcelay, E., Hermida, O.G., Saiz-Diaz, R.A., Bermejo, F., Ayuso, M.S., Martin-Requero, A., 2003. Ca²⁺/calmodulin-dependent modulation of cell cycle elements pRb and p27kip1 involved in the enhanced proliferation of lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia. *Neurobiol. Dis.* 13, 254–263.

DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G.Y., Karydas, A., Seeley, W.W., Josephs, K.A., Coppola, G., Geschwind, D.H., Wszolek, Z.K., Feldman, H., Knopman, D.S., Petersen, R.C., Miller, B.L., Dickson, D.W., Boylan, K.B., Graff-Radford, N.R., Rademakers, R., 2011. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9orf72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72, 245–256. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.011>.

Dormann, D., Capell, A., Carlson, A.M., Shankaran, S.S., Rodde, R., Neumann, M., Kremmer, E., Matsuwaki, T., Yamanouchi, K., Nishihara, M., Haass, C., 2009. Proteolytic processing of TAR DNA binding protein-43 by caspases produces C-terminal fragments with disease defining properties independent of progranulin. *J. Neurochem.* 110, 1082–1094. doi:JNC6211 [pii]10.1111/j.1471-4159.2009.06211.x [doi].

Eriksen, J.L., Mackenzie, I.R., 2008. Progranulin: normal function and role in neurodegeneration. *J. Neurochem.* 104, 287–297. doi:JNC4968 [pii]10.1111/j.1471-4159.2007.04968.x [doi].

Gao, X., Joselin, A.P., Wang, L., Kar, A., Ray, P., Bateman, A., Goate, A.M., Wu, J.Y., 2010. Progranulin promotes neurite outgrowth and neuronal differentiation by regulating GSK-3 β . *Protein Cell* 1, 552–562. <http://dx.doi.org/10.1007/s13238-010-0067-1>.

Gerasimovskaya, E.V., Tucker, D.A., Weiser-Evans, M., Wenzlau, J.M., Klemm, D.J., Banks, M., Stenmark, K.R., 2005. Extracellular ATP-induced proliferation of adventitial fibroblasts requires phosphoinositide 3-kinase, Akt, mammalian target of rapamycin, and p70 S6 kinase signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 280, 1838–1848. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M409466200>.

Gladkevich, A., Kauffman, H.F., Korf, J., 2004. Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 28, 559–576. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2004.01.009>.

Hallskog, C., Dijksterhuis, J.P., Kilander, M.B., Becerril-Ortega, J., Villaseca, J.C., Lindgren, E., Arenas, E., Schulte, G., 2012. Heterotrimeric G protein-dependent WNT-5A signaling to ERK1/2 mediates distinct aspects of microglia proinflammatory transformation. *J. Neuroinflamm.* 9, 111. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-9-111>.

He, Z., Ismail, A., Kriazhev, L., Sadvakassova, G., Bateman, A., 2002. Progranulin (PC-cell-derived growth factor/acroganin) regulates invasion and cell survival. *Cancer Res.* 62, 5590–5596.

Herrup, K., Yang, Y., 2007. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 368–378. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2124>.

Hoglinger, G.U., Breunig, J.J., Depboylu, C., Rouaux, C., Michel, P.P., Alvarez-Fischer, D., Bouthillier, A.L., Degregori, J., Oertel, W.H., Rakic, P., Hirsch, E.C., Hunot, S., 2007. The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 3585–3590. doi:0611671104 [pii]10.1073/pnas.0611671104 [doi].

Holm, I.E., Englund, E., Mackenzie, I.R., Johannsen, P., Isaacs, A.M., 2007. A reassessment of the neuropathology of frontotemporal dementia linked to chromosome 3. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 66, 884–891. <http://dx.doi.org/10.1097/nen.0b013e3181567f02>.

Huang, H., He, X., Deng, X., Li, G., Ying, G., Sun, Y., Shi, L., Benovic, J.L., Zhou, N., 2010. Bombyx adipokinetic hormone receptor activates extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 via G protein-dependent PKA and PKC but beta-arrestin-independent pathways. *Biochemistry* 49, 10862–10872. <http://dx.doi.org/10.1021/bi1014425>.

Huelsken, J., Birchmeier, W., 2001. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 547–553.

Hussemann, J.W., Nochlin, D., Vincent, I., 2000. Mitotic activation: a convergent mechanism for a cohort of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* 21, 815–828. doi:S0197458000002219 [pii].

Ibarreta, D., Urcelay, E., Parrilla, R., Ayuso, M.S., 1998. Distinct pH homeostatic features in lymphoblasts from Alzheimer's disease patients. *Ann. Neurol.* 44, 216–222.

Inestrosa, N.C., Arenas, E., 2010. Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 77–86. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2755>.

- Janda, C.Y., Waghray, D., Levin, A.M., Thomas, C., Garcia, K.C., 2012. Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* 337, 59–64. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1222879>.
- Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J., Waterfield, M.D., 2001. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17, 615–675. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.615>.
- Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., Matsumoto, S., 2012. Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases. *Acta Physiol.* 204, 17–33. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02294.x>.
- Kilander, M.B., Dijksterhuis, J.P., Ganji, R.S., Bryja, V., Schulte, G., 2011. WNT-5A stimulates the GDP/GTP exchange at pertussis toxin-sensitive heterotrimeric G proteins. *Cell. Signal.* 23, 550–554. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.11.004>.
- Krishan, A., 1975. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell. Biol.* 66, 188–193.
- Kuhl, M., Sheldahl, L.C., Park, M., Miller, J.R., Moon, R.T., 2000. The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* 16, 279–283.
- L'Episcopo, F., Tirole, C., Testa, N., Caniglia, S., Morale, M.C., Deleidi, M., Serapide, M.F., Pluchino, S., Marchetti, B., 2012. Plasticity of subventricular zone neuroprogenitors in MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) mouse model of Parkinson's disease involves cross talk between inflammatory and Wnt/beta-catenin signaling pathways: functional consequences for neuroprotection and repair. *J. Neurosci.* 32, 2062–2085. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.5259-11.2012>.
- Lee, H.P., Kudo, W., Smith, M.A., Lee, H.G., 2011. Early induction of c-Myc is associated with neuronal cell death. *Neurosci. Lett.* 505, 124–127. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2011.10.004>.
- Li, B., Zhong, L., Yang, X., Andersson, T., Huang, M., Tang, S.J., 2011. WNT5A signaling contributes to Abeta-induced neuroinflammation and neurotoxicity. *PLoS One* 6, e22920. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0022920>.
- Liang, H., Chen, Q., Coles, A.H., Anderson, S.J., Pihan, G., Bradley, A., Gerstein, R., Jurecic, R., Jones, S.N., 2003. Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell* 4, 349–360.
- Lopez de Munain, A., Alzualde, A., Gorostidi, A., Otaegui, D., Ruiz-Martinez, J., Indakoechea, B., Ferrer, I., Perez-Tur, J., Saenz, A., Bergareche, A., Barandiaran, M., Pozza, J.J., Zabalza, R., Ruiz, I., Urtasun, M., Fernandez-Manchola, I., Olasagasti, B., Espinal, J.B., Olaskoaga, J., Ruibal, M., Moreno, F., Carrera, N., Masso, J.F., 2008. Mutations in progranulin gene: clinical, pathological, and ribonucleic acid expression findings. *Biol. Psychiatry* 63, 946–952 doi:S0006-3223(07)00823-2 [pii] 10.1016/j.biopsych.2007.08.015.
- Malhotra, S., Baba, Y., Garrett, K.P., Staal, F.J., Gerstein, R., Kincade, P.W., 2008. Contrasting responses of lymphoid progenitors to canonical and noncanonical Wnt signals. *J. Immunol.* 181, 3955–3964.
- McKhann, G.M., Albert, M.S., Grossman, M., Miller, B., Dickson, D., Trojanowski, J.Q., 2001. Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Arch. Neurol.* 58, 1803–1809.
- Meloch, S., Pouyssegur, J., 2007. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26, 3227–3239. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210414>.
- Miller, J.R., 2002. The Wnts. *Genome Biol.* 3, REVIEWS3001.
- Monami, G., Gonzalez, E.M., Hellman, M., Gomella, L.G., Baffa, R., Iozzo, R.V., Morrión, A., 2006. Proepithelin promotes migration and invasion of 5637 bladder cancer cells through the activation of ERK1/2 and the formation of a paxillin/FAK/ERK complex. *Cancer Res.* 66, 7103–7110. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can.06-0633>.
- Moreno, F., Indakoechea, B., Barandiaran, M., Alzualde, A., Gabilondo, A., Estanga, A., Ruiz, J., Ruibal, M., Bergareche, A., Marti-Masso, J.F., Lopez de Munain, A., 2009. "Frontotemporal dementia: clinical phenotype associated with the c.709-1G>A PGRN mutation. *Neurology* 73, 1367–1374.
- Munoz, U., Bartolome, F., Bermejo, F., Martín-Requero, A., 2008. Enhanced proteasome-dependent degradation of the CDK inhibitor p27(kip1) in immortalized lymphocytes from Alzheimer's dementia patients. *Neurobiol. Aging* 29, 1474–1484.
- Neumann, M., Rademakers, R., Roeder, S., Baker, M., Kretschmar, H.A., Mackenzie, I.R., 2009. A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain* 132, 2922–2931.
- Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., McCluskey, L.F., Miller, B.L., Masliah, E., Mackenzie, I.R., Feldman, H., Feiden, W., Kretschmar, H.A., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2006. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130–133 doi:314/5796/130 [pii] 10.1126/science.1134108.
- Niu, L.J., Xu, R.X., Zhang, P., Du, M.X., Jiang, X.D., 2012. Suppression of Frizzled-2-mediated Wnt/Ca²⁺ signaling significantly attenuates intracellular calcium accumulation in vitro and in a rat model of traumatic brain injury. *Neuroscience* 213, 19–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.03.057>.
- Parker, S.J., Meyerowitz, J., James, J.L., Liddell, J.R., Crouch, P.J., Kanninen, K.M., White, A.R., 2012. Endogenous TDP-43 localized to stress granules can subsequently form protein aggregates. *Neurochem. Int.* 60, 415–424. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2012.01.019>.
- Premi, E., Padovani, A., Borroni, B., 2012. Frontotemporal lobar degeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* 724, 114–127. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-0653-2_9.
- Rademakers, R., Cruts, M., van Broeckhoven, C., 2004. The role of tau (MAPT) in frontotemporal dementia and related tauopathies. *Hum. Mutat.* 24, 277–295. <http://dx.doi.org/10.1002/humu.20086>.
- Ratnavalli, E., Brayne, C., Dawson, K., Hodges, J.R., 2002. The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology* 58, 1615–1621.
- Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simon-Sanchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., Kalimo, H., Paetau, A., Abramzon, Y., Remes, A.M., Kaganovich, A., Scholz, S.W., Duckworth, J., Ding, J., Harmer, D.W., Hernandez, D.G., Johnson, J.O., Mok, K., Ryten, M., Trabzuni, D., Guerreiro, R.J., Orrell, R.W., Neal, J., Murray, A., Pearson, J., Jansen, I.E., Sondervan, D., Seelaar, H., Blake, D., Young, K., Halliwell, N., Callister, J.B., Toulson, G., Richardson, A., Gerhard, A., Snowden, J., Mann, D., Neary, D., Nalls, M.A., Peuralinna, T., Jansson, L., Ioviti, V.M., Kaivorinne, A.L., Holtta-Vuori, M., Ikonen, E., Sulkava, R., Benatar, M., Wu, J., Chio, A., Restagno, G., Borghero, G., Sabatelli, M., Heckerman, D., Rogaeva, E., Zinman, L., Rothstein, J.D., Sendtner, M., Drepper, C., Eichler, E.E., Alkan, C., Abdullaev, Z., Pack, S.D., Dutra, A., Pak, E., Hardy, J., Singleton, A., Williams, N.M., Heutink, P., Pickering-Brown, S., Morris, H.R., Tienari, P.J., Traynor, B.J., 2011. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72, 257–268. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.010>.
- Rohrer, J.D., Beck, J., Warren, J.D., King, A., Al Sarraj, S., Holton, J., Revesz, T., Collinge, J., Mead, S., 2009. Corticobasal syndrome associated with a novel 1048_1049insG progranulin mutation. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 80, 1297–1298. <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.2008.169383>.
- Rosen, E.Y., Wexler, E.M., Versano, R., Coppola, G., Gao, F., Winden, K.D., Oldham, M.C., Martens, L.H., Zhou, P., Farese Jr., R.V., Geschwind, D.H., 2011. Functional genomic analyses identify pathways dysregulated by progranulin deficiency, implicating Wnt signaling. *Neuron* 71, 1030–1042. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.021>.
- Stieler, J., Grimes, R., Weber, D., Gartner, W., Sabbagh, M., Arendt, T., 2012. Multivariate analysis of differential lymphocyte cell cycle activity in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 33, 234–241. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.03.001>.
- Stone, J.G., Siedlak, S.L., Tabaton, M., Hirano, A., Castellani, R.J., Santocane, C., Perry, G., Smith, M.A., Zhu, X., Lee, H.G., 2011. The cell cycle regulator phosphorylated retinoblastoma protein is associated with tau pathology in several tauopathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 578–587. <http://dx.doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182204414>.
- Ueberham, U., Arendt, T., 2005. The expression of cell cycle proteins in neurons and its relevance for Alzheimer's disease. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 4, 293–306.
- Van Damme, P., Van Hoecke, A., Lambrechts, D., Vanacker, P., Bogaert, E., van Swieten, J., Carmeliet, P., Van Den Bosch, L., Robberecht, W., 2008. Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival. *J. Cell Biol.* 181, 37–41. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200712039>.
- Vuga, L.J., Ben-Yehudah, A., Kovakova-Naumovski, E., Oriss, T., Gibson, K.F., Feghali-Bostwick, C., Kaminski, N., 2009. WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 41, 583–589. <http://dx.doi.org/10.1165/jrmb.2008-0201OC>.
- Watts, G.D., Wymer, J., Kovach, M.J., Mehta, S.G., Mumm, S., Darvish, D., Pestronk, A., Whyte, M.P., Kimonis, V.E., 2004. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat. Genet.* 36, 377–381. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1332>.
- Weinberg, R.A., 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323–330.
- Wexler, E.M., Rosen, E., Lu, D., Osborn, G.E., Martin, E., Raybould, H., Geschwind, D.H., 2011. Genome-wide analysis of a Wnt1-regulated transcriptional network implicates neurodegenerative pathways. *Sci. Signal.* 4, ra65. <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.2002282>.
- Wilson, C.H., McIntyre, R.E., Arends, M.J., Adams, D.J., 2010. The activating mutation R201C in GNAS promotes intestinal tumorigenesis in Apc(Min/+) mice through activation of Wnt and ERK1/2 MAPK pathways. *Oncogene* 29, 4567–4575. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2010.202>.
- Wishart, T.M., Parson, S.H., Gillingwater, T.H., 2006. Synaptic vulnerability in neurodegenerative disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 733–739 doi:10.1097/01.jnen.0000228202.35163.c4 [doi] 00005072-200608000-00001 [pii].
- Yu, J.M., Jun, E.S., Jung, J.S., Suh, S.Y., Han, J.Y., Kim, J.Y., Kim, K.W., Jung, J.S., 2007. Role of Wnt5a in the proliferation of human glioblastoma cells. *Cancer Lett.* 257, 172–181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2007.07.011>.
- Zanocco-Marani, T., Bateman, A., Romano, G., Valentini, B., He, Z.H., Baserga, R., 1999. Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor. *Cancer Res.* 59, 5331–5340.
- Zhang, Y.J., Xu, Y.F., Dickey, C.A., Buratti, E., Baralle, F., Bailey, R., Pickering-Brown, S., Dickson, D., Petrucelli, L., 2007. Progranulin mediates caspase-dependent cleavage of TAR DNA binding protein-43. *J. Neurosci.* 27, 10530–10534 doi:27/10530/130 [pii] 10.1523/JNEUROSCI.3421-07.2007.
- Zhu, J., Nathan, C., Jin, W., Sim, D., Ashcroft, G.S., Wahl, S.M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wright, C.D., Ding, A., 2002. Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell* 111, 867–878.
- Zhu, X., Raina, A.K., Perry, G., Smith, M.A., 2004. Alzheimer's disease: the two-hit hypothesis. *Lancet Neurol.* 3, 219–226. [http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422\(04\)00707-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(04)00707-0).

4

Aumento de los niveles de PGRN e inhibición de la vía MEK/ERK1/2: Dos nuevas posibles dianas para el tratamiento de la DLFT asociada a mutaciones en *progranulina*

Carolina Alquézar, Noemí Esteras, Ana de la Encarnación, Ainoha Alzualde, Fermín Moreno, Adolfo López de Munain, Ángeles Martín-Requero.

“The Increase of PGRN levels and blockade of the ERK pathway: Upstream and downstream strategies for the treatment of PGRN deficient frontotemporal dementia” Submitted.

Resumen

La degeneración lobar frontotemporal (DLFT) causada por mutaciones en el gen progranulina (GRN) que llevan a la haploinsuficiencia de la proteína es el tipo de demencia más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer. En trabajos previos de nuestro laboratorio se ha descrito que los linfoblastos de pacientes de DLFT que expresan la mutación c.709-1G>A en GRN presentan alteraciones en su actividad proliferativa y en la resistencia a la muerte celular inducida por la retirada del suero. Nuestros resultados muestran también que la haploinsuficiencia de PGRN activa una vía de señalización que implica la estimulación de CDK6/pRb mediada por ERK1/2.

En este trabajo, hemos estudiado el efecto de drogas capaces de aumentar los niveles de PGRN, ya sea activando la expresión del gen (SAHA) o actuando a nivel pos-traducciona (cloroquina), y de inhibidores específicos de la ruta MEK/ERK1/2 como selumetinib y MEK162 en revertir el fenotipo patogénico asociado a la haploinsuficiencia de PGRN. El aumento de los niveles de PGRN tras la adición de SAHA y cloroquina fue capaz de bloquear la sobreactivación de ERK1/2 en los linfoblastos portadores de la mutación en GRN. Además, tanto las drogas que aumentan los niveles de PGRN como los inhibidores selectivos de ERK1/2 fueron capaces de normalizar la respuesta proliferativa exacerbada y la sobreactivación de la vía CDK6/pRb en los linfoblastos deficientes en PGRN. Al igual que en las líneas linfoblásticas, ambos tipos de compuestos fueron capaces de revertir el fenotipo patogénico en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, en las que se había silenciado previamente el gen GRN.

En conjunto, considerando que estas drogas pueden ser usadas en la clínica con buena tolerancia para el tratamiento de otras enfermedades, nuestros resultados sugieren que estos compuestos pueden usarse para el tratamiento de la DLFT asociada a mutaciones en GRN.

Increasing PGRN levels and blockade of the ERK pathway: Upstream and downstream strategies for the treatment of PGRN deficient frontotemporal dementia

^{1,6}Carolina Alquezar, ¹Noemí Esteras, ¹Ana de la Encarnación, ^{2,3,5}Fermín
Moreno, ^{2,3,4,5}Adolfo López de Munain, and ^{1,6}Ángeles Martín-Requero

¹Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) Madrid, ²Neuroscience Area-Institute Bionostia, ³Department of Neurology, Hospital Donostia, ⁴Department of Neurosciences. University of Basque Country, San Sebastián, ⁵CIBER de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), ⁶CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER)

ABSTRACT:

Frontotemporal lobar degeneration (FTLD) is one of the most common types of dementia. Loss-of-function progranulin (*GRN*) mutations have been identified as the major cause of FTLD with TDP-43 protein inclusions (FTLD-TDP). Previously we reported enhanced proliferative activity and increased resistance to serum deprivation-induced apoptosis in immortalized lymphoblasts from FTLD-TDP patients carrying the c.709-1G>A null *GRN* mutation.

Progranulin (PGRN) haploinsufficiency enhanced a signaling cascade involving ERK1/2-mediated increases in CDK6 content and pRb phosphorylation. In the present work we have investigated the effects of drugs able to increase PGRN levels, either activating the *GRN* gene expression such as SAHA, or at post-translational level as chloroquine (CQ), as well as specific inhibitors of the ERK1/2 signaling cascade. SAHA and CQ were effective in restoring the PGRN levels of c.709-1G>A carriers, and prevented the enhanced activation of ERK1/2 activity. Selumetinib, and MEK160, inhibitors of the ERK1/2 cascade, normalized the response of PGRN deficient lymphoblasts to serum activation. Both sets of drugs ultimately modulate the CDK6/pRb pathway and therefore regulate cell survival/death mechanisms. Considering that these drugs are already used in clinic for treatment of other diseases, with good tolerance, it is plausible that they may serve as novel therapeutic drugs for FTLD associated to *GRN* mutations.

Key words: FTLD-TDP, lymphocytes, cell proliferation, progranulin, ERK1/2, CDK6

INTRODUCTION

Frontotemporal lobar degeneration (FTLD) is a neurodegenerative syndrome considered the second cause of presenile dementia accounting for 20% of all the cases under the age of 65 years (Ikeda *et al*, 2004; Rabinovici and Miller, 2010; Ratnavalli *et al*, 2002). This syndrome is a clinically and pathologically heterogeneous group of neurodegenerative disorders characterized by behavioral, cognitive and language disturbances, associated with degeneration of the frontal and temporal lobes (Neary *et al*, 1998).

FTLD patients can be classified into three clinical syndromes depending on the early and predominant symptoms: a behavioural variant (bvFTD) and two language variants; Semantic dementia (SD) and Primary Progressive Non-fluent Aphasia (PPNFA) (Neary *et al*, 1998; Rabinovici *et al*, 2010). Each clinical variant is associated with a distinct regional pattern of brain atrophy and, to a varying degree, a characteristic histopathology. Additionally, other neurodegenerative disorders such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS), progressive supranuclear palsy

(PSP), parkinsonism with frontotemporal dementia (FTDP) or corticobasal degeneration syndrome (CBS) are closely related to FTLD (Burrell *et al*, 2011; Deng *et al*, 2011; Lomen-Hoerth, 2004; Van Langenhove *et al*, 2012).

Pathologically, these disorders share deposits of abnormal proteins in neuroectodermic cells, and severe cell loss with atrophy of vulnerable cortical and subcortical structures. Histochemically, FTLD can be categorized according to the major component of the cellular inclusions deposited in the brain. In the majority of cases, the pathological protein is either the microtubule-associated protein tau or the transactive response DNA-binding protein TDP-43 (FTLD-tau, FTLD-TDP respectively), a small number of cases present inclusions of fused in sarcoma (FUS) protein (FTLD-FUS) (Cairns *et al*, 2007; Mackenzie *et al*, 2011a; Mackenzie *et al*, 2011b).

A positive family history of FTLD is present in 25-50% of cases and the transmission is usually autosomal dominant (Goldman *et al*, 2007; Rademakers *et al*, 2012; Sieben *et al*, 2012). A few genes have been associated with familial FTLD including *microtubule-*

associated protein tau (*MAPT*) (Poorkaj *et al*, 1998; Spillantini *et al*, 1998), *progranulin* (*GRN*) (Baker *et al*, 2006; Cruts *et al*, 2006), *transactive response* (*TAR*) *DNA-binding protein-43* (*TARDBP*) (Gitcho *et al*, 2009), *chromatin-modifying 2B protein* (*CHMP2B*) (Holm *et al*, 2007), *Valosin-containing protein* (*VCP*) (Watts *et al*, 2004), and *chromosome 9 open reading frame 72* (*C9ORF72*) (DeJesus-Hernandez *et al*, 2011). Recently, two new rare mutations associated with FLD and ALS have been identified in the *SQSTM1* (Le Ber *et al*, 2013) and *UBQLN2* (Deng *et al*, 2011; Vengoechea *et al*, 2013) genes.

A large number of FTLD-TDP patients have been identified to harbor loss-of-function mutations (including null mutations) in the gene encoding progranulin (*GRN*) (Baker *et al*, 2006; Cruts *et al*, 2006). Up to now more than 60 different mutations in *GRN* have been described associated with the etiology of the disease (www.molgen.ua.ac.be/FTDmutations/) (Gijssels *et al*, 2008). Most of the pathogenic mutations result in null allele, suggesting that FTLD in these families results from progranulin (PGRN) haploinsufficiency (Cruts *et al*, 2006).

Current treatment options for FTLD remain very limited, mainly involving therapy for the mood and behavioral symptoms (Kishner, 2010). Identification of molecular targets to slow or hopefully to prevent the neurodegenerative process relies in a better understanding of both the biological functions of PGRN, and the role of protein haploinsufficiency in the development of dementia. For this purpose, familial forms of the disease with known pathogenic mutations provide an opportunity to get inside in FTLD-TDP pathogenesis and for fast-track development of new therapies for PGRN-deficient FTLD.

Previous work from our and others laboratories demonstrated that lymphoblastoid cell lines derived from patients suffering from neurological disorders have a disease-specific molecular signature, and therefore they have been considered useful tools to study molecular mechanisms controlling cell vulnerability that may be similar to those involved in neuronal loss (Bartolome *et al*, 2010; Esteras *et al*, 2013; Munoz *et al*, 2008). In this work, we have used the Epstein Barr virus to immortalize peripheral lymphocytes of patients of FTLD-TDP and asymptomatic individuals carrying the c.709-1G>A non-sense *GRN* mutation, as well as control individuals. This mutation was previously described in members of a small number of families of Basque descent (Lopez de Munain *et al*, 2008; Moreno *et al*, 2009). We found important alterations in the cellular response to serum stimulation or withdrawal in PGRN deficient lymphoblasts that ultimately depend on changes in CDK6/pRb pathway (Alquezar *et al*, 2012; Alquezar *et al*, 2011). In searching for signaling molecules affected by the PGRN deficit, we detected the enhancement of a signaling cascade, which activates the ERK1/2 pathway in a Ca²⁺, protein kinase

C (PKC) and pertussis toxin-dependent manner (Alquezar *et al*, 2013).

The present work was undertaken to evaluate whether restoring PGRN levels or targeting the ERK1/2 cascade would normalize the cellular response of lymphoblasts harboring the c.709-1G>A *GRN* mutation. Considering the haploinsufficiency mechanism, *GRN* is a particularly appealing gene for drug targeting. On the other hand, given that PGRN deficit appears to induced alterations in the ERK1/2 cascade (Alquezar *et al*, 2013) and the fact that new, highly selective inhibitors of BRAF (v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog B1) and MEK1/2 (Mitogen-activated protein kinase kinase or ERK kinase 1 and 2), the upstream activators of ERK1/2, have shown promising results in clinical trials, including in previously intractable diseases such as melanoma (Ascierto *et al*, 2013; Bennouna *et al*, 2011), it is possible to envision new avenues for therapeutic intervention in PGRN-deficient FTLD.

Our results indicate that increasing PGRN levels or, alternatively using ERK1/2-targeted drugs, restore the normal cell response to serum stimulation, by preventing the overactivation of the CDK6/pRb cascade in c.709-1G>A *GRN* mutation carriers.

MATERIALS AND METHODS

Materials

All components for cell culture were obtained from Invitrogen (Barcelona, Spain). Progranulin (human) (recombinant) was obtained from Enzo (Zandhoven, Belgium). Poly (vinylidene) fluoride (PVDF) membranes were purchased from Bio-Rad (Richmond, CA). The enhanced chemiluminescence (ECL) system was from Amersham (Uppsala, Sweden). Other reagents were of molecular biology grade. Antibodies against human CDK6, pRb, β -actin and α -tubulin were obtained from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). Antibodies against Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) XP and p44/42 MAP Kinase were obtained from Cell Signaling. Anti-Granulin (EPR3781) was obtained from Abcam (Cambridge, UK). Chloroquine diphosphate salt (CQ) and Elastase from human leukocytes were obtained from Sigma-Aldrich (Tres Cantos, Spain), Suberoylanilide Hydroxamic Acid, Vorinostat (SAHA) was obtained from Cayman Chemical company (Michigan, USA), selumetinib (AZD6244) was obtained from Selleck Chemicals (Houston, USA) MEK162 (ARRY-438162) was obtained from AdooQ Bioscience (Irvine, Canada) and PD98059 was obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany).

Cell lines

A total of 29 individuals were enrolled in this study: 19 carriers of the c.709-1G>A *GRN* gene mutation (7 of them patients of FTLD-TDP and 12 asymptomatic) and 10 control individuals without mutation in *GRN* and

without sign of neurological degeneration. Asymptomatic and control individuals were relatives of patients. All patients were diagnosed as FTD in the Donostia Hospital by applying consensus criteria as published elsewhere (McKhann *et al*, 2001). Demographic information for control and *GRN* mutation carriers is presented in Table 1.

All study protocols were approved by the Donostia Hospital and the Spanish Council of Higher Research Institutional Review Board and are in accordance with National and European Union Guidelines. In all cases, peripheral blood samples were taken after written informed consent of the patients or their relatives to determine the presence of the c.709-1G>A *GRN* mutation and to establish the lymphoblastoid cell lines.

Establishment of lymphoblastic cell lines was performed in our laboratory as previously described (Ibarreta *et al*, 1998), by infecting peripheral blood lymphocytes with the Epstein Barr virus (EBV). Cells were grown in suspension in T flasks in an upright position, in approximately 8 ml of RPMI-1640 medium that contained 2 mM L-glutamine, 100 µg/ml streptomycin/penicillin and 10 % (v/v) fetal bovine serum (FBS) and maintained in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C. Fluid was routinely changed every three days by removing the medium above the settled cells and replacing it with an equal volume of fresh medium.

GRN knockdown neuroblastoma SH-SY5Y cell lines

Stable *GRN* knockdown neuroblastoma SH-SY5Y cells (Clone # 207) was a gift from Drs. Joselin and Wu from the Center for Genetic Medicine (Northwestern University, Chicago, IL US). *GRN* knockdown was achieved by using pSUPERIOR RNAi construct as previously described (Gao *et al*, 2010). The target sequence of 19 nucleotides targeted against nucleotides 207–226 (#207) of the human *GRN* mRNA was designed. The 64 nt short hairpin RNA sense and antisense primer sequences were 5'-gatcccgccactctgcacatctttatcaagataaagatgcaggagtgcccttttgaaa-3' and 5'-agcttttccaaaagccactctgcacatctttatcttgaataaagatgcaggagtggccggg-3'.

The sense and antisense primer pairs were annealed and ligated into the pSUPERIOR vector (OligoEngine) according to manufacturer's instructions. The vector control was also stably introduced into SH-SY5Y cells to generate the control cell line

Determination of cell proliferation

Cell proliferation was determined by total cell counting, using a TC10™ Automated Cell Counter from Bio-Rad Laboratories, S.A. (Madrid, Spain). EBV-immortalized lymphocytes from control and *GRN* mutation carriers were seeded at an initial cell concentration of 1 x 10⁶ cells x ml⁻¹. Cells were enumerated everyday thereafter. In some experiments,

cell proliferation was assessed by the 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation method using an enzyme-linked immunoassay kit procured from Roche (Madrid, Spain) or by the MTT assay (Mitsiades *et al*, 2002) obtaining similar results.

Cell cycle analysis

Exponentially growing cultures of cell lines were seeded at an initial concentration of 1 x 10⁶ cells x ml⁻¹. Cell cycle analysis was performed using a standard method (Krishan, 1975). Cells were fixed in 75% ethanol for 1 hour at room temperature. Subsequent centrifugation of the samples was followed by incubation of cells in PBS containing 1 mg/ml of RNase at room temperature for 20 minutes and staining with propidium iodide (PI; 25 µg/ml). Cells were analyzed in an EPICS-XL cytofluorimeter (Coulter Científica, Móstoles, Spain). Estimates of cell cycle phase distributions were obtained by computer analysis of DNA content distributions.

Immunoblotting analysis.

Cells were harvested, washed in PBS and then lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1% Nonidet P-40), containing 1 mM sodium orthovanadate, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM sodium pyrophosphate and protease inhibitor Complete Mini Mixture (Roche, Mannheim, Germany). 50-100 µg of protein from cell extracts were fractionated on a SDS polyacrylamide gel, and transferred to PVDF membrane. The membranes were then blocked with 1% Bovine Serum Albumine (BSA) (Sigma) and incubated, overnight at 4°C, with primary antibodies in the following concentrations, CDK6 (1:1000); pRb (1:500); β-actin (1:500); α-tubulin (1:1000); Anti-Progranulin (1:500); Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (XP) (1:2000) and p44/42 MAP Kinase (ERK1/2) (1:1000). The specificity of the antibodies used in this work was checked by omitting the primary antibody in the incubation medium. Signals from the primary antibodies were amplified using species-specific antisera conjugated with horseradish peroxidase (Bio-Rad) and detected with a chemiluminiscent substrate detection system ECL. Protein band densities were quantified using Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) after scanning the images with a GS-800 densitometer from Bio-Rad.

Quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from cell cultures using Trizol reagent (Invitrogen, Alcobendas, Madrid, Spain). RNA yields were quantified spectrophotometrically and RNA quality was checked by the A260/A280 ratio and on a 1.2% agarose gel to determine the integrity of 18S and 28S ribosomal RNA. RNA was then treated with DNase I Amplification Grade (Invitrogen, Alcobendas, Madrid, Spain). One microgram was reverse transcribed with

Targeting PGRN levels and ERK1/2 activity in peripheral cell from FTLT patients

the Superscript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Alcobendas, Madrid, Spain). Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed in triplicates using TaqMan Universal PCR MasterMix No Amperase UNG (Applied Biosystems, Alcobendas, Madrid, Spain) reagent according to the manufacturer's protocol. Primers were designed using the Universal ProbeLibrary for Human (Roche Applied Science, Madrid, Spain) and used at a final concentration of 20 μ M. The sequences of the forward and reverse primers used are the following: for *GRN*, 5'-tctgtagtctgagcgctaccc-3' and 5'-agggtccacatggtctgc-3'; for β -actin, 5'-ccaaccgcgagaagatga-3' and 5'-ccagaggcgtacaggatag-3'. Real time quantitative PCR was performed in the Bio-Rad iQ5 system using a thermal profile of an initial 5-minute melting step at 95 $^{\circ}$ C followed by 40 cycles at 95 $^{\circ}$ C for 10 seconds and 60 $^{\circ}$ C for 60 seconds. Relative messenger RNA (mRNA) levels of the genes of interest were normalized to β -actin expression using the simplified comparative threshold cycle delta-delta CT method ($2^{-(\Delta\Delta CT)}$).

Statistical analysis.

Statistical analyses were performed on GraphPad Prism 5 for Macintosh (La Jolla, CA, USA). All the statistical data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical significance was estimated by analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test for multiple comparisons. Differences were considered significant at a level of $p < 0.05$.

RESULTS

Proliferative activity of lymphoblasts from control or c.709-1G>A *GRN* mutation carriers individuals

Fig. 1 summarizes the distinct response of EBV-immortalized lymphocytes bearing a loss-of-function *GRN* mutation c.709-1G>A to serum stimulation. As expected PGRN content of mutant lymphoblasts, either from asymptomatic or FTLT-TDP patients, was reduced by 50% compared with the protein content of control cells (Fig. 1A). In agreement with previous reports (Alquezar *et al.*, 2012; Alquezar *et al.*, 2013), PGRN deficient lymphoblasts show higher proliferative activity, determined by the rate of BrdU incorporation into DNA than control cells (Fig. 1B), or by direct trypan blue excluding cell counting over three days (Fig. 1C, left panel). Addition of exogenous recombinant human PGRN (rhPGRN) to the culture medium prevented the enhanced stimulation of proliferation of lymphoblasts bearing the *GRN* mutation (Fig. 1C, medium panel). The effect of rhPGRN disappeared when the exogenous PGRN was previously degraded by elastase (Fig. 1C, right panel). As shown in Fig. 1D, incubation of rhPGRN with 0.1 U/ml of Elastase for three hours was sufficient to completely degrade PGRN. Taken together, these

results suggest that the anti-proliferative effect of added rhPGRN is due to the full-length protein rather than to granulin peptides. Previously, we reported that PGRN deficiency induces the activation of the ERK1/2/CDK6/pRb pathway (Alquezar *et al.*, 2013). Here we show that the treatment of mutant lymphoblasts with rhPGRN rescued the normal ERK1/2 and CDK6 activities (Fig. 1E).

Effects of SAHA and chloroquine on viability of lymphoblasts from control or c.709-1G>A *GRN* mutation carriers individuals

Given that PGRN deficit seems to be causally associated with neurodegeneration in FTLT-TDP patients (Baker *et al.*, 2006; Mackenzie *et al.*, 2011a), treatments to increase the PGRN levels are envisioned as promising therapies. For this reason, we considered interesting to evaluate the efficacy of already US Food and Drug Administration-approved drugs known to increase PGRN content, such as vorinostat, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), a histone deacetylase (HDAC) (Cenik *et al.*, 2011) or chloroquine, an alkalinizing reagent used in the treatment or prevention of malaria (Capell *et al.*, 2011) to restore the normal response of PGRN deficient, peripheral cells from patients.

We first investigated the effect of SAHA and CQ on viability of lymphoblasts from control and c.709-1G>A *GRN* mutation carriers, asymptomatic or FTLT-TDP patients. To this end, lymphoblasts were incubated in the absence or in the presence of these drugs for 72 hours and cell viability was determined by the MTT assay. Treatment with escalating concentrations (0-2 μ M) of SAHA suppressed the cell viability in a dose-dependent manner (Fig. 2A). Similar results were obtained with increasing concentrations of CQ up to 20 μ M (Fig. 2B). Maximal effects of SAHA or CQ were obtained at 1 μ M or 10 μ M respectively. The proliferative activity of control and PGRN deficient lymphoblasts was assessed by total cell counting after treating cells with either 1 μ M SAHA or 10 μ M CQ for 72 hours. As shown in Fig. 2C and D, the addition of SAHA or CQ abrogated the enhanced proliferative response of PGRN deficient cells, affecting in a lesser extent the proliferation of control cells. The effect of these drugs mimicked the addition of rhPGRN.

Since the change in cell number depends on the balance between cell proliferation and cell death, we tested whether SAHA or CQ treatment induced cell death by necrosis/apoptosis. For this purpose, we analyzed the distribution of cells in the cell cycle phases. We did not observe significant changes in the proportion of sub-G₀/G₁ hypodiploid cells, characteristic of apoptosis/necrosis, in control and PGRN deficient lymphoblasts after SAHA or CQ treatment (Fig. 3). SAHA was more effective in decreasing the percentage of cells in S/G₂M phases than CQ. Taken together, these results suggest that the decreased cell number in cultures of *GRN* mutation

c.709-1G>A carriers, in the presence of SAHA or CQ truly reflects a decrease in cell proliferation.

The analysis of mRNA and protein levels of PGRN in control and c.709-1G>A *GRN* mutation carriers lymphoblasts revealed that, at the concentrations used, both drugs were effective in increasing the cellular levels of protein (Fig 4 B). As expected only the deacetylase inhibitor SAHA increased the mRNA PGRN levels (Fig. 4 A).

Effects of SAHA and chloroquine on downstream signaling pathway

Previous work from this laboratory indicated that PGRN haploinsufficiency increased the proliferative activity of lymphoblasts derived from carriers of the c.709-1G>A *GRN* mutation, by activating the ERK1/2/CDK6/pRb pathway (Alquezar *et al.*, 2013). We, therefore, evaluated the impact of SAHA and CQ on this cascade. For these experiments cells were harvested 6 hours after serum stimulation, when maximal activation of ERK1/2 is reached. As expected, lymphoblasts from PGRN deficient lymphoblasts show enhanced levels of pERK1/2, (Fig. 5A). Incubation of cells with either SAHA or CQ prevented the enhanced ERK1/2 stimulation of c.709-1G>A carrier lymphoblasts without affecting the phosphorylation of ERK in control cells (Fig. 5A). We next sought to check whether SAHA, and CQ are blocking effectively CDK6 levels and enzyme activity. To this end, cells were preincubated with the corresponding drug 30 minutes before serum stimulation. 24 hours later, cells were harvested to determine by Western blotting the levels of CDK6, and pRb phosphorylation status. Fig. 5B shows how SAHA or CQ treatments were effective in decreasing the content of CDK6 of lymphoblasts carrying the c.709-1G>A *GRN* mutation up to levels similar to those of control cells. As expected, both drugs also diminished the hyperphosphorylation of pRb in PGRN deficient lymphoblasts (Fig. 5C).

Effects of ERK1/2 cascade inhibitors on viability of lymphoblasts from control or c.709-1G>A *GRN* mutation carriers individuals

Providing that ERK1/2 activity alterations underlie the enhanced proliferative response of PGRN deficient lymphoblasts, we were interested in testing the effects of selective ERK inhibitors, orally available and approved for clinical use that eventually could be used as therapeutic drugs in FTLD. We focused on selumetinib (AZD6244) (Selleck Chemicals, Munich, Germany), and in MEK162 (ARRY-438162) (AdooQ Bioscience, Irvine, CA, USA), small molecules ATP-uncompetitive inhibitors of MEK1/2, the upstream activator of ERK1/2 (Davies *et al.*, 2007; Yeh *et al.*, 2007). The sensitivity of lymphoblastoid cell lines from control or carriers of the *GRN* mutation c.709-1G>A individuals to selumetinib is shown in Fig 6A. Control cells were moderately sensitive to selumetinib treatment (up to 2.5 μ M); however this drug inhibited

viability of PGRN deficient cells in a dose-dependent manner. Maximal effects were observed at 1 μ M (Fig. 6A). At this dose, selumetinib was able to inhibit the phosphorylation of ERK1/2 after serum stimulation (Fig. 6B). For comparison, the effect of the known pharmacological MEK inhibitor PD98059 (20 μ M) is also shown. After 72 hours of cell treatment with 1 μ M selumetinib, it was observed that the drug abrogated the serum-mediated increased proliferation of PGRN deficient cells, affecting very little the proliferation of control cells (Fig. 6C).

In Fig 7, we summarized the results obtained with the ERK1/2 inhibitor MEK162. Maximal effect of this drug was observed at 0.1 μ M concentration (Fig 7A). In a similar manner than selumetinib, treatment of lymphoblasts with 0.1 μ M of MEK162 induced a significant decrease in the levels of pERK1/2 (Fig. 7B) and inhibited the enhanced proliferation of the PGRN deficient lymphoblasts, (Fig. 7C). We next studied the effects of these inhibitors of the ERK1/2 activity in CDK6 levels and enzyme activity. Fig. 8 shows how both treatments were effective in decreasing the content of CDK6 (Fig 8A) and the levels of pRb (Fig 8.B), in lymphoblasts from c.709-1G>A *GRN* mutation carriers up to levels similar to those of control cells.

Effects of PGRN enhancers and ERK1/2 inhibitors on PGRN deficient neuroblastoma SH-SY5Y cells.

We considered interesting to validate the above-described results in lymphoblastoid cell lines by testing the effects of PGRN levels-modifying drugs or ERK1/2 inhibitors in a neuronal cell model of PGRN deficiency. To this end, we used *GRN* knockdown human neuroblastoma SH-SY5Y cell line, generated in Dr. Wu lab with a pSUPERIOR RNAi construct containing the target sequence corresponding to nucleotide sequences 207 to 226 specific for human *GRN* gene. In agreement with a previous report from this laboratory (Alquezar *et al.*, 2013), the KD SH-SY5Y cells show enhanced levels of BrdU incorporation into DNA, compared with control cells. Normal rates of BrdU incorporation can be rescued by the addition the PGRN enhancers SAHA and CQ, mimicking the effect of the addition of exogenous PGRN (rhPGRN) (Fig. 9A, left panel). The efficacy of these drugs altering the PGRN abundance and ERK1/2 activity in KD SH-SY5Y cells is presented in Fig. 9A, right panel. Similar results, preventing the enhanced BrdU incorporation into DNA in *GRN* KD cells, were obtained after the treatment with the ERK1/2 inhibitors selumetinib or MEK162 (Fig. 9 B). Taken together, these results indicate that PGRN deficiency induce similar alterations in the ERK1/2 pathway in neuronal and non-neuronal cells.

DISCUSSION

In the last decade, remarkable progress made in the understanding of FTLD biology has unraveled it as both a set of clinically different syndromes and

disorders with unique genetic and neuropathological profiles. Increasing knowledge of pathogenic molecular mechanisms has provided a rationale for designing novel therapeutic strategies. There are not yet Food and Drug Administration-approved treatments for FTLD-TDP, however the PGRN haploinsufficiency associated with *GRN* mutations, as well as the insights into pathological processing of TDP-43 and in signaling pathways involved in FTLD-TDP open new perspectives for the identification of appropriate targets.

We previously reported an altered response of immortalized lymphocytes from carriers of a single pathogenic splicing mutation in the *progranulin* gene (*GRN*) (c.709-1G>A) to serum stimulation-induced enhanced cell proliferation, which involves ERK1/2 activation (Alquezar *et al.*, 2013). The alteration of cell cycle control of PGRN deficient lymphoblasts was considered a systemic manifestation of the disease.

A previous study using a global mRNA expression profiling approach in brains from cases of FTLD-TDP associated to *GRN* mutations confirmed the cell cycle as significantly enriched in upregulated genes (Chen-Plotkin *et al.*, 2008). On the other hand, it is well recognized the involvement of cell cycle-related events in neurodegenerative disorders (Arendt, 2012; Herrup and Yang, 2007; Hoglinger *et al.*, 2007; Ueberham and Arendt, 2005). Thus, peripheral cells from patients provide a useful model to test novel therapies. Moreover, we previously demonstrated that EBV-immortalized lymphocytes retain the cellular response of fresh obtained lymphocytes, to serum-induced stimulation of cell proliferation (Bartolome *et al.*, 2010; Munoz *et al.*, 2008). This study was undertaken to investigate the effects of drugs able to increase PGRN levels and kinase inhibitors on the ERK1/2 signaling pathway leading to the activation of CDK/pRb and proliferation of PGRN deficient lymphoblasts. We found that treatment of cells with SAHA, CQ, selumetinib or MEK162 showed no signs of toxicity but inhibited cell proliferation in a dose-dependent manner. The effects of these drugs were bigger in PGRN deficient lymphoblasts.

In agreement with previous results (Alquezar *et al.*, 2012; Alquezar *et al.*, 2013), untreated lymphoblasts from individuals carrying the c.709-1G>A *GRN* mutation, asymptomatic or diagnosed of FTLD-TDP, showed enhanced cell proliferation when compared with cells from control subjects. The inhibition of proliferation induced by SAHA or CQ correlated with increased PGRN content. SAHA, a known histone deacetylase (HDAC) inhibitor was shown to effectively increase PGRN mRNA and protein levels in human lymphoblasts (Cenik *et al.*, 2011), while CQ increases the PGRN content by a posttranslational mechanism (Capell *et al.*, 2011). Both drugs were able to effectively normalize the relative abundance of PGRN in c.709-1G>A *GRN* mutation carrier lymphoblasts. Moreover the inhibitory effect of SAHA and CQ

mimicked the effect of addition of full-length rhPGRN to lymphoblast from *GRN* mutation carriers.

It was previously reported that PGRN haploinsufficient lymphoblasts show enhanced ERK1/2 activation following serum stimulation (Alquezar *et al.*, 2013). Our results suggest that the mechanism underlying the anti-proliferative effects of SAHA and CQ is the capacity of these drugs to abrogate the serum-mediated stimulation of the ERK1/2 activity, which then leads to decreased CDK6 content and pRb phosphorylation, key regulators of the G₁-S cell cycle transition.

SAHA and CQ demonstrated therapeutic potential in other neurodegenerative diseases (Kazantsev and Thompson, 2008; Solomon and Lee, 2009). Therefore, these PGRN-enhancers drugs may be useful for prevention and treatment of FTLD-TDP associated to PGRN haploinsufficiency. In addition, the fact that SAHA was shown to induce changes in inflammatory markers in a mouse model of septic shock (Finkelstein *et al.*, 2010) suggest that SAHA may have secondary beneficial effects in FTLD-TDP besides normalizing PGRN deficiency.

The ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) pathway, comprising the protein kinases RAF (v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1), MEK1/2 (mitogen-activated protein kinase kinase) and ERK1/2, is frequently deregulated in human cancers and other diseases, making ERK1/2 cascade an attractive target for the development of new inhibitors (Kono *et al.*, 2006). Since the ERK1/2 pathway appears to be overactivated in PGRN-deficient cells (Alquezar *et al.*, 2013) we hypothesized that ERK1/2 inhibitors may be able to blunt the enhanced proliferative activity of lymphoblasts bearing the c.709-1G>A *GRN* mutation. In this study, we have tested the effects of selumetinib and MEK162. Both drugs are small molecules, orally available, ATP-noncompetitive inhibitors of MEK1/2 (Akinleye *et al.*, 2013). The safety profile and tolerability of selumetinib has been evaluated in a 2-part, multicenter, ascending dose, phase I clinical study (Adjei *et al.*, 2008). This trial showed the tolerability of selumetinib, with the most common treatment-related toxicities being rash, diarrhea, nausea, and fatigue. MEK162 is also being evaluated in phase I and II clinical trials in patients with advanced solid tumors (Ascierto *et al.*, 2013). In PGRN deficient cells the inhibition of ERK1/2 activity after the treatment with selumetinib and MEK162 restored CDK6 levels and proliferation rates to values similar to those of control cells.

Regarding the pathophysiological relevance of our findings in lymphoblasts from *GRN* mutation carriers, it is worth mentioning that both modifiers of PGRN levels and ERK1/2 inhibitors had similar effects in knockdown *GRN* SH-SY5Y neuroblastoma cells, i.e., reducing the rate of BrdU incorporation into DNA. Taken together these observations support the rationale for the use of peripheral cells from patients, and in particular EBV-transformed lymphocytes from FTLD

patients as a model to further understand disease biology and to test novel therapies. Finally, SAHA, CQ, selumetinib, and MEK162 were shown to cross the blood-brain barrier (Ascierto *et al*, 2013; Hirata *et al*, 2011; Matsuoka and Yang, 2012; Palmieri *et al*, 2009), and demonstrated therapeutic potential in other neurodegenerative diseases. Thus, these drugs offer promise as novel treatments for FTLN associated to GRN mutations.

FUNDING AND DISCLOSURE

This work has been supported by grants from Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2011-28603) and Fundación Ramón Areces to AM-R. Dr. López de Munain received research support from the Basque Government, Spain (SAIO11.PR11BN002). The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES:

- Adjei AA, Cohen RB, Franklin W, Morris C, Wilson D, Molina JR, *et al* (2008). Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral, small-molecule mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) in patients with advanced cancers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**(13): 2139-2146.
- Akinleye A, Furqan M, Mukhi N, Ravella P, Liu D (2013). MEK and the inhibitors: from bench to bedside. *Journal of hematology & oncology* **6**: 27.
- Alquezar C, Esteras N, Alzualde A, Moreno F, Ayuso MS, Lopez de Munain A, *et al* (2012). Inactivation of CDK/pRb pathway normalizes survival pattern of lymphoblasts expressing the FTLN-progranulin mutation c.709-1G>A. *PloS one* **7**(5): e37057.
- Alquezar C, Esteras N, Bartolome F, Merino JJ, Alzualde A, Munain AL, *et al* (2011). Alteration in cell cycle-related proteins in lymphoblasts from carriers of the c.709-1G>A PGRN mutation associated with FTLN-TDP dementia. *Neurobiol Aging*.
- Alquezar C, Esteras N, De la Encarnacion A, Alzualde A, Moreno F, Ayuso MS, *et al* (2013). PGRN haploinsufficiency increased Wnt5a signaling in peripheral cells from FTLN-progranulin mutation carriers. *Neurobiol Aging*.
- Arendt T (2012). Cell cycle activation and aneuploid neurons in Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology* **46**(1): 125-135.
- Ascierto PA, Schadendorf D, Berking C, Agarwala SS, van Herpen CM, Queirolo P, *et al* (2013). MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. *The lancet oncology* **14**(3): 249-256.
- Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, *et al* (2006). Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* **442**(7105): 916-919.
- Bartolome F, Munoz U, Esteras N, Alquezar C, Collado A, Bermejo-Pareja F, *et al* (2010). Simvastatin overcomes the resistance to serum withdrawal-induced apoptosis of lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **67**(24): 4257-4268.
- Bennouna J, Lang I, Valladares-Ayerbes M, Boer K, Adenis A, Escudero P, *et al* (2011). A Phase II, open-label, randomised study to assess the efficacy and safety of the MEK1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) versus capecitabine monotherapy in patients with colorectal cancer who have failed one or two prior chemotherapeutic regimens. *Investigational new drugs* **29**(5): 1021-1028.
- Burrell JR, Kiernan MC, Vucic S, Hodges JR (2011). Motor neuron dysfunction in frontotemporal dementia. *Brain : a journal of neurology* **134**(Pt 9): 2582-2594.
- Cairns NJ, Bigio EH, Mackenzie IR, Neumann M, Lee VM, Hatanpaa KJ, *et al* (2007). Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta neuropathologica* **114**(1): 5-22.
- Capell A, Liebscher S, Fellerer K, Brouwers N, Willem M, Lammich S, *et al* (2011). Rescue of progranulin deficiency associated with frontotemporal lobar degeneration by alkalizing reagents and inhibition of vacuolar ATPase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**(5): 1885-1894.
- Cenik B, Sephton CF, Dewey CM, Xian X, Wei S, Yu K, *et al* (2011). Suberoylanilide hydroxamic acid (vorinostat) up-regulates progranulin transcription: rational therapeutic approach to frontotemporal dementia. *The Journal of biological chemistry* **286**(18): 16101-16108.
- Cruts M, Gijselsinck I, van der Zee J, Engelborghs S, Wils H, Pirici D, *et al* (2006). Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* **442**(7105): 920-924.
- Chen-Plotkin AS, Geser F, Plotkin JB, Clark CM, Kwong LK, Yuan W, *et al* (2008). Variations in the progranulin gene affect global gene expression in frontotemporal lobar degeneration. *Human molecular genetics* **17**(10): 1349-1362.
- Davies BR, Logie A, McKay JS, Martin P, Steele S, Jenkins R, *et al* (2007). AZD6244 (ARRY-142886), a potent inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 1/2 kinases: mechanism of action in vivo, pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, and potential for combination in preclinical models. *Molecular cancer therapeutics* **6**(8): 2209-2219.
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, *et al* (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* **72**(2): 245-256.
- Deng HX, Chen W, Hong ST, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, *et al* (2011). Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* **477**(7363): 211-215.
- Esteras N, Alquezar C, Bermejo-Pareja F, Bialopiotrowicz E, Wojda U, Martin-Requero A (2013). Downregulation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity by calmodulin KII modulates p21Cip1 levels and survival of immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* **34**(4): 1090-1100.
- Finkelstein RA, Li Y, Liu B, Shuja F, Fukudome E, Velmahos GC, *et al* (2010). Treatment with histone deacetylase inhibitor attenuates MAP kinase mediated

Targeting PGRN levels and ERK1/2 activity in peripheral cell from FTLD patients

- liver injury in a lethal model of septic shock. *The Journal of surgical research* **163**(1): 146-154.
- Gao X, Joselin AP, Wang L, Kar A, Ray P, Bateman A, *et al* (2010). Progranulin promotes neurite outgrowth and neuronal differentiation by regulating GSK-3 β . *Protein & cell* **1**(6): 552-562.
- Gijselsinck I, Van Broeckhoven C, Cruts M (2008). Granulin mutations associated with frontotemporal lobar degeneration and related disorders: an update. *Human mutation* **29**(12): 1373-1386.
- Gitcho MA, Bigio EH, Mishra M, Johnson N, Weintraub S, Mesulam M, *et al* (2009). TARDBP 3'-UTR variant in autopsy-confirmed frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 proteinopathy. *Acta neuropathologica* **118**(5): 633-645.
- Goldman JS, Adamson J, Karydas A, Miller BL, Hutton M (2007). New genes, new dilemmas: FTLD genetics and its implications for families. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias* **22**(6): 507-515.
- Herrup K, Yang Y (2007). Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nature reviews Neuroscience* **8**(5): 368-378.
- Hirata Y, Yamamoto H, Atta MS, Mahmoud S, Oh-hashii K, Kiuchi K (2011). Chloroquine inhibits glutamate-induced death of a neuronal cell line by reducing reactive oxygen species through sigma-1 receptor. *Journal of neurochemistry* **119**(4): 839-847.
- Hoglinger GU, Breunig JJ, Depboylu C, Rouaux C, Michel PP, Alvarez-Fischer D, *et al* (2007). The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**(9): 3585-3590.
- Holm IE, Englund E, Mackenzie IR, Johansson P, Isaacs AM (2007). A reassessment of the neuropathology of frontotemporal dementia linked to chromosome 3. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **66**(10): 884-891.
- Ibarreta D, Urcelay E, Parrilla R, Ayuso MS (1998). Distinct pH homeostatic features in lymphoblasts from Alzheimer's disease patients. *Ann Neurol* **44**(2): 216-222.
- Ikeda M, Ishikawa T, Tanabe H (2004). Epidemiology of frontotemporal lobar degeneration. *Dementia and geriatric cognitive disorders* **17**(4): 265-268.
- Kazantsev AG, Thompson LM (2008). Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nature reviews Drug discovery* **7**(10): 854-868.
- Kirshner HS (2010). Frontotemporal dementia and primary progressive aphasia: an update. *Current neurology and neuroscience reports* **10**(6): 504-511.
- Kono M, Dunn IS, Durda PJ, Butera D, Rose LB, Haggerty TJ, *et al* (2006). Role of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the regulation of human melanocytic antigen expression. *Molecular cancer research* : MCR **4**(10): 779-792.
- Krishan A (1975). Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *The Journal of cell biology* **66**(1): 188-193.
- Le Ber I, Camuzat A, Guerreiro R, Bouya-Ahmed K, Bras J, Nicolas G, *et al* (2013). SQSTM1 Mutations in French Patients With Frontotemporal Dementia or Frontotemporal Dementia With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA neurology*.
- Lomen-Hoerth C (2004). Characterization of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Dementia and geriatric cognitive disorders* **17**(4): 337-341.
- Lopez de Munain A, Alzualde A, Gorostidi A, Otaegui D, Ruiz-Martinez J, Indakoetxea B, *et al* (2008). Mutations in progranulin gene: clinical, pathological, and ribonucleic acid expression findings. *Biol Psychiatry* **63**(10): 946-952.
- Mackenzie IR, Neumann M, Baborie A, Sampathu DM, Du Plessis D, Jaros E, *et al* (2011a). A harmonized classification system for FTLD-TDP pathology. *Acta neuropathologica* **122**(1): 111-113.
- Mackenzie IR, Neumann M, Cairns NJ, Munoz DG, Isaacs AM (2011b). Novel types of frontotemporal lobar degeneration: beyond tau and TDP-43. *Journal of molecular neuroscience* : MN **45**(3): 402-408.
- Matsuoka Y, Yang J (2012). Selective inhibition of extracellular signal-regulated kinases 1/2 blocks nerve growth factor to brain-derived neurotrophic factor signaling and suppresses the development of and reverses already established pain behavior in rats. *Neuroscience* **206**: 224-236.
- McKhann GM, Albert MS, Grossman M, Miller B, Dickson D, Trojanowski JQ (2001). Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Archives of neurology* **58**(11): 1803-1809.
- Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, Hideshima T, *et al* (2002). Biologic sequelae of nuclear factor-kappaB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* **99**(11): 4079-4086.
- Moreno F, Indakoetxea B, Barandiaran M, Alzualde A, Gabilondo A, Estanga A, *et al* (2009). "Frontotemporoparietal" dementia: clinical phenotype associated with the c.709-1G>A PGRN mutation. *Neurology* **73**(17): 1367-1374.
- Munoz U, Bartolome F, Bermejo F, Martin-Requero A (2008). Enhanced proteasome-dependent degradation of the CDK inhibitor p27(kip1) in immortalized lymphocytes from Alzheimer's dementia patients. *Neurobiol Aging* **29**(10): 1474-1484.
- Neary D, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D, Black S, *et al* (1998). Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* **51**(6): 1546-1554.
- Palmieri D, Lockman PR, Thomas FC, Hua E, Herring J, Hargrave E, *et al* (2009). Vorinostat inhibits brain metastatic colonization in a model of triple-negative breast cancer and induces DNA double-strand breaks. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**(19): 6148-6157.
- Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, *et al* (1998). Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol* **43**(6): 815-825.
- Rabinovici GD, Miller BL (2010). Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management. *CNS drugs* **24**(5): 375-398.
- Rademakers R, Neumann M, Mackenzie IR (2012). Advances in understanding the molecular basis of frontotemporal dementia. *Nature reviews Neurology* **8**(8): 423-434.
- Ratnavalli E, Brayne C, Dawson K, Hodges JR (2002). The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology* **58**(11): 1615-1621.

Targeting PGRN levels and ERK1/2 activity in peripheral cell from FTLD patients

- Sieben A, Van Langenhove T, Engelborghs S, Martin JJ, Boon P, Cras P, *et al* (2012). The genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration. *Acta neuropathologica* **124**(3): 353-372.
- Solomon VR, Lee H (2009). Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *European journal of pharmacology* **625**(1-3): 220-233.
- Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B (1998). Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7737-7741.
- Ueberham U, Arendt T (2005). The expression of cell cycle proteins in neurons and its relevance for Alzheimer's disease. *Current drug targets CNS and neurological disorders* **4**(3): 293-306.
- Van Langenhove T, van der Zee J, Van Broeckhoven C (2012). The molecular basis of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum. *Annals of medicine* **44**(8): 817-828.
- Vengoechea J, David MP, Yaghi SR, Carpenter L, Rudnicki SA (2013). Clinical variability and female penetrance in X-linked familial FTD/ALS caused by a P506S mutation in UBQLN2. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration*.
- Watts GD, Wymer J, Kovach MJ, Mehta SG, Mumm S, Darvish D, *et al* (2004). Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nature genetics* **36**(4): 377-381.
- Yeh TC, Marsh V, Bernat BA, Ballard J, Colwell H, Evans RJ, *et al* (2007). Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**(5): 1576-1583.

Targeting PGRN levels and ERK1/2 activity in peripheral cell from FTLD patients

TABLES:

Table 1.
Characteristics of individuals enrolled in this study

	Control	c.709-1G>A mutation carriers	
		Asymptomatic	FTLD Patients
Age (years)	51.8±4.3	52.8±4.3	65.3±2.3
Sex, female, % (n)	50% (5)	50% (6)	100% (7)
Age at onset	-	-	61±0.6
phenotype	Asymptomatic	Asymptomatic	FTD-bv; CBS
Family history, % (n)	70% (7)	50%(6)	71.4% (5)
Serum PGRN, pg/ml	126.7±13	47.5±7.3	44±5.6

Control: Individuals without sing of neurological degeneration; c.709-1G>A: PGRN Progranulin mutation; n: number of subjects. Values are expressed as mean±SE. CBS: Cortico basal syndrome; FTD-bv: Frontotemporal dementia (behaviour).

Targeting PGRN levels and ERK1/2 activity in peripheral cell from FTLD patients

FIGURES:

FIGURE 1

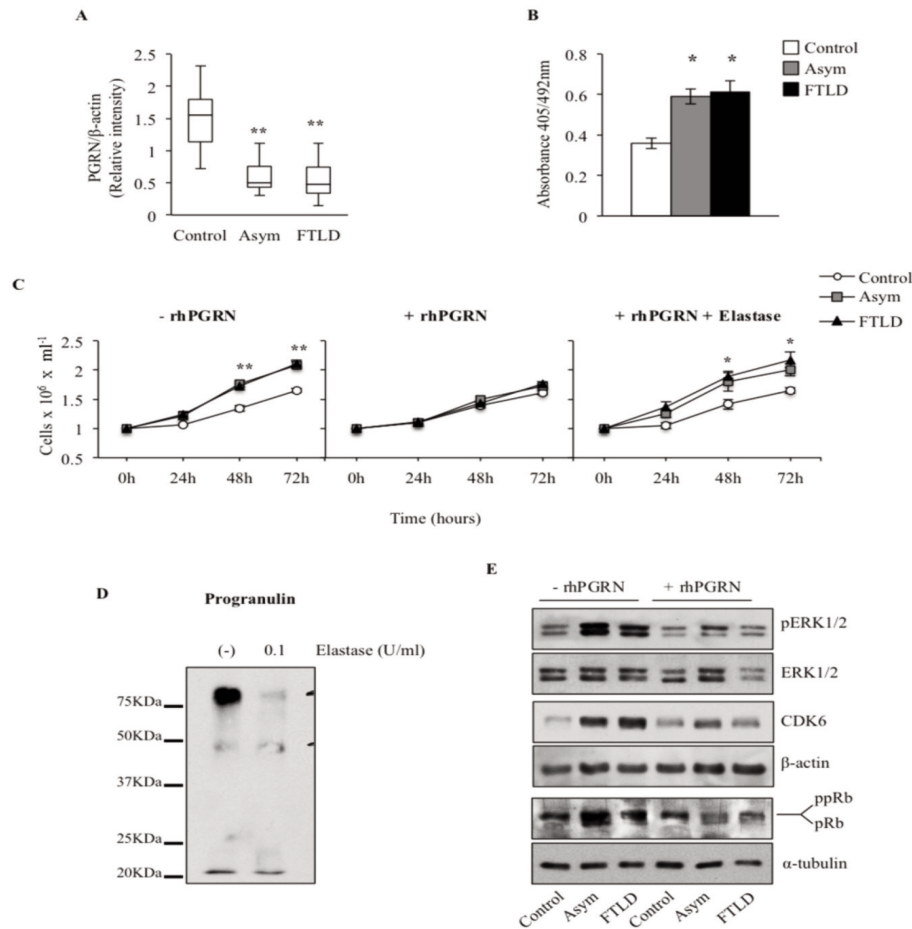


Figure 1

Proliferative activity of lymphoblasts from control and c.709-1G>A *GRN* mutation carriers individuals.

A: Immortalized lymphocytes from control and c.709-1G>A *GRN* mutation carriers, asymptomatic or FTLD-TDP patients, were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$ and were incubated in RPMI medium containing 10% FBS, 24 hours later cells were harvested for cell extracts preparation. PGRN levels were determined by Western blotting. Values shown are the mean \pm SEM of densitometric analyses from cell extracts of all individuals enrolled in this studio. B: Proliferative response of control and PGRN deficient cells. 100.000 cells/well were seeded in 96-well plates for 24 hours and pulsed with 10 μM BrdU for an additional period of 4 hours. DNA synthesis was assessed by BrdU incorporation method according to the manufacturer's instructions. Proliferation was expressed as absorbance of stimulated minus that of non-stimulated cultures. Each bar represents the mean \pm SEM of six independent experiments performed in triplicate. C: Lymphoblastoid cell lines were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$ and were incubated for 72 hours with rhPGRN (100 ng/ml) alone or preincubated with Elastase (0.1 U/ml) for 3 hours was added to the medium. Cell proliferation was determined everyday by counting the cells excluding trypan blue using a TC10TM Automated Cell Counter. Values shown are the mean \pm SEM of all cell lines used in this work. D: rhPGRN (100 mg/ml) was incubated in the absence and presence of 0.1 U/ml of Elastase for 3 hours and the levels of PGRN protein were determined by Western blot. E: Representative immunoblots showing the effects of rhPGRN on pERK1/2, CDK6 levels and pRb phosphorylation status. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ significantly different from control cells.

Targeting PGRN levels and ERK1/2 activity in peripheral cell from FTLD patients

FIGURE 2

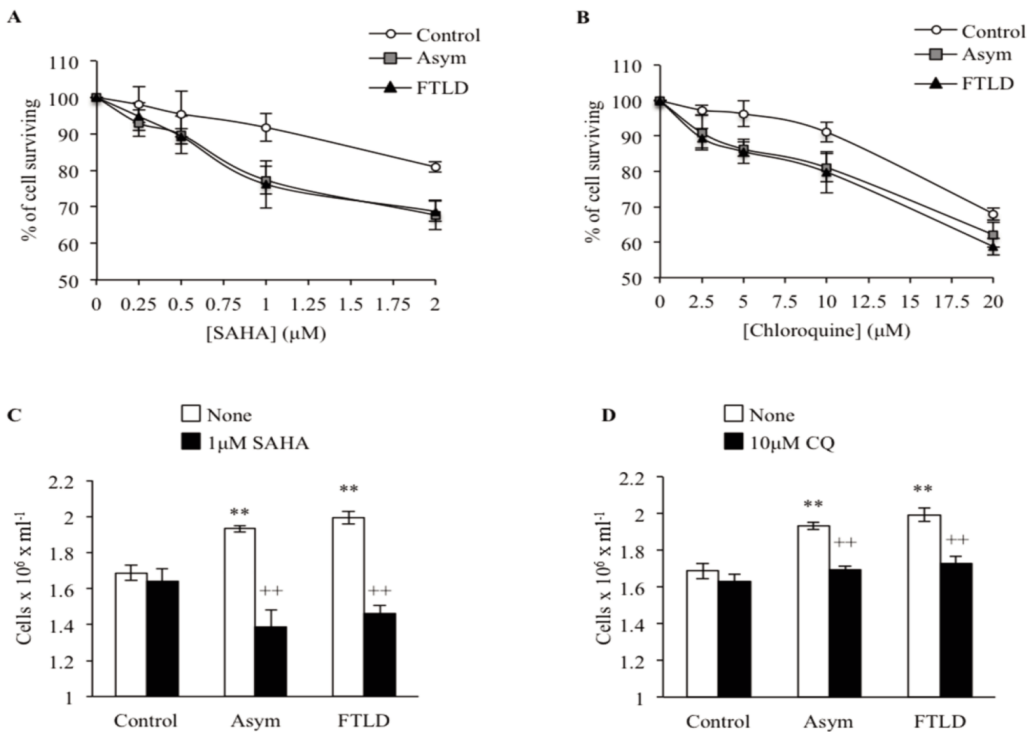


Figure 2
Effects of SAHA and chloroquine on the proliferation of lymphoblasts from control and c.709-1G>A *GRN* mutation carriers individuals

Immortalized lymphocytes from control and c.709-1G>A *GRN* mutation carriers, asymptomatic or FTLD-TDP patients, were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$ and were incubated in medium containing 10% FBS, in the absence or in presence of increasing doses of SAHA (0-2 μM) (A) and CQ (0-20 μM) (B) for 72 hours. A total of 100.000 cells per well were seeded in a 96-well plaque for the MTT assay. Results represent the % of cell survival of treated cells referred to untreated ones. C, D: Effect of the treatment with SAHA 1 μM (C) and CQ 10 μM (D) on proliferation in control and PGRN deficient lymphoblasts. Aliquots were taken for cell counting 72 hours after the drug administration. Data shown are the mean \pm SEM of six determinations carried out with different cell lines. ** $p < 0.01$ significantly different from control cells. ++ $p < 0.01$ significantly different from untreated cells.

FIGURE 3

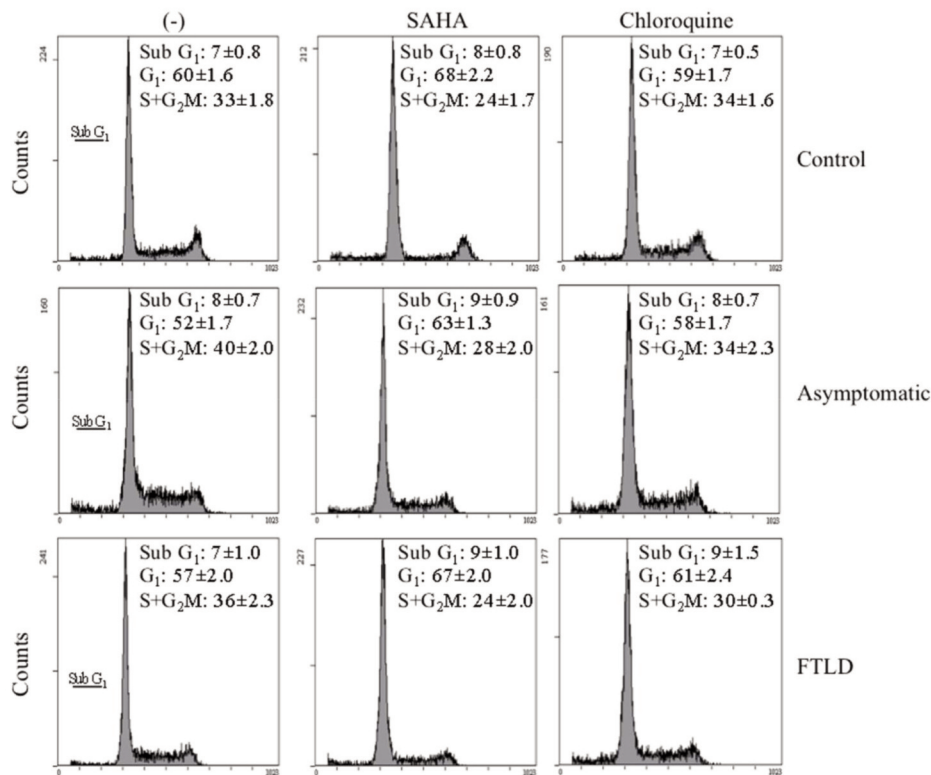


Figure 3

Cell cycle distribution of lymphoblast from control and c.7091-G>A *GRN* mutation carriers after SAHA or chloroquine treatment.

Immortalized lymphocytes from control and *GRN* mutation carriers were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$ and cultured in RPMI medium containing 10% FBS in the absence or in the presence of SAHA (1 μM) and CQ (10 μM). 36 hours after drugs addition, cells were harvested, fixed, and analyzed by flow cytometry as described under Methods. The percentage of cells in the different cell cycle phases is indicated for each condition.

Targeting PGRN levels and ERK1/2 activity in peripheral cell from FTLD patients

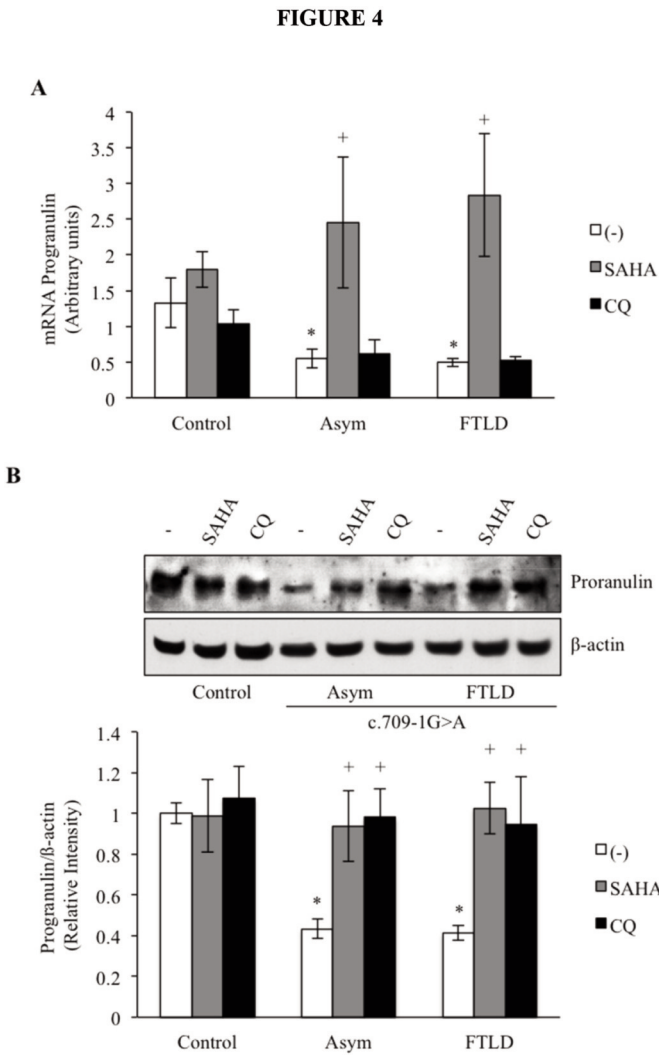


Figure 4

Effects of SAHA and chloroquine on mRNA PGRN and protein levels.

Immortalized lymphocytes from control and c.709-1G>A *GRN* mutation carriers, FTLD patients or asymptomatic individuals were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$ and cultured in RPMI medium containing 10% FBS in the absence or in the presence of SAHA (1 μM) and CQ (10 μM). 24 hours later cells were harvested to isolate RNA and to prepare cell lysates. A: Progranulin mRNA expression levels were analyzed by quantitative RT-PCR. Data shown are the mean \pm SEM of three different observations in all the subjects enrolled in this study. B: Representative immunoblot showing PGRN protein content after drugs treatment. Densitometric measurements were performed on individual immunoblots and values indicate the mean of protein levels normalized to the corresponding β -actin levels \pm SEM for experiments carried out with seven different cell lines for each group. * $p < 0.05$ significantly different from control cells. + $p < 0.05$ significantly different from untreated cells.

Targeting PGRN levels and ERK1/2 activity in peripheral cell from FTLD patients

FIGURE 5

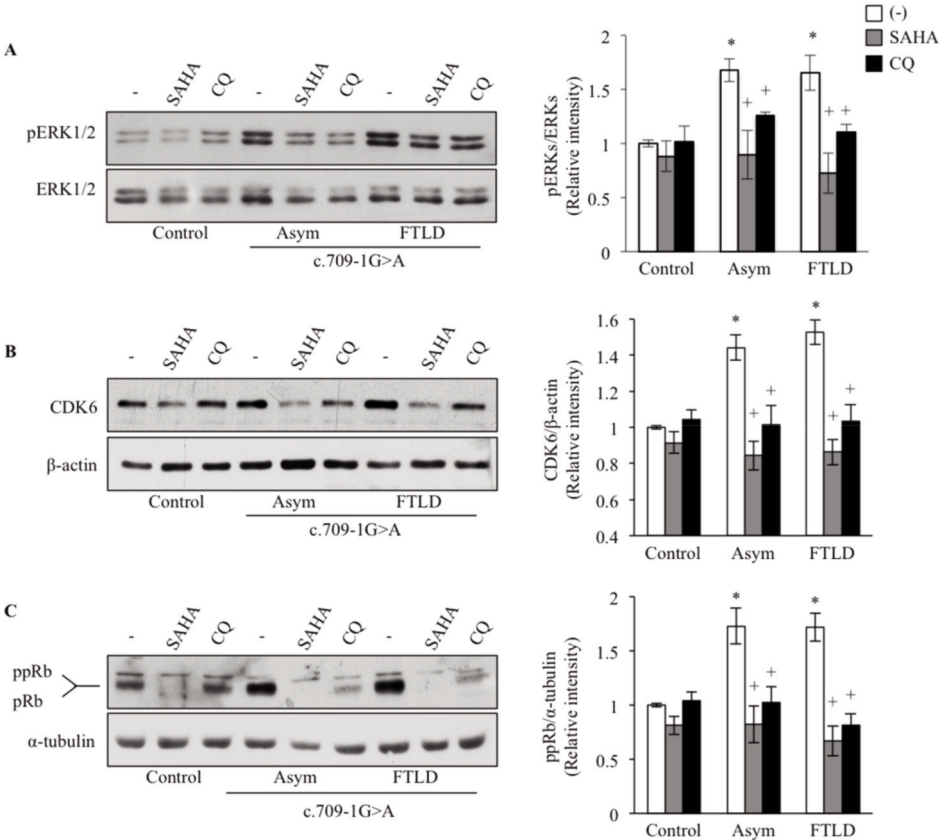


Figure 5

Effects of SAHA and chloroquine in ERK1/2 activity, CDK6 levels and pRb phosphorylation status.

Immortalized lymphocytes from control and c.709-1G>A *GRN* mutation carriers, were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$, and were incubated in RPMI medium containing 10% FBS in the absence or in the presence of SAHA (1 μM) or CQ (10 μM). Cell extracts were prepared 6 hours after drug administration to determine ERK1/2 activation (Fig. 5 A) and 24 hours after treatment to analyze CDK6 and pRb levels (Fig. 5 B and C). Representative immunoblots are shown. The densitometric data represent the mean \pm SEM of different experiments using all the individuals enrolled in this study. *p<0.05 significantly different from control cells. +p<0.05 significantly different from untreated cells.

Targeting PGRN levels and ERK1/2 activity in peripheral cell from FTLD patients

FIGURE 6

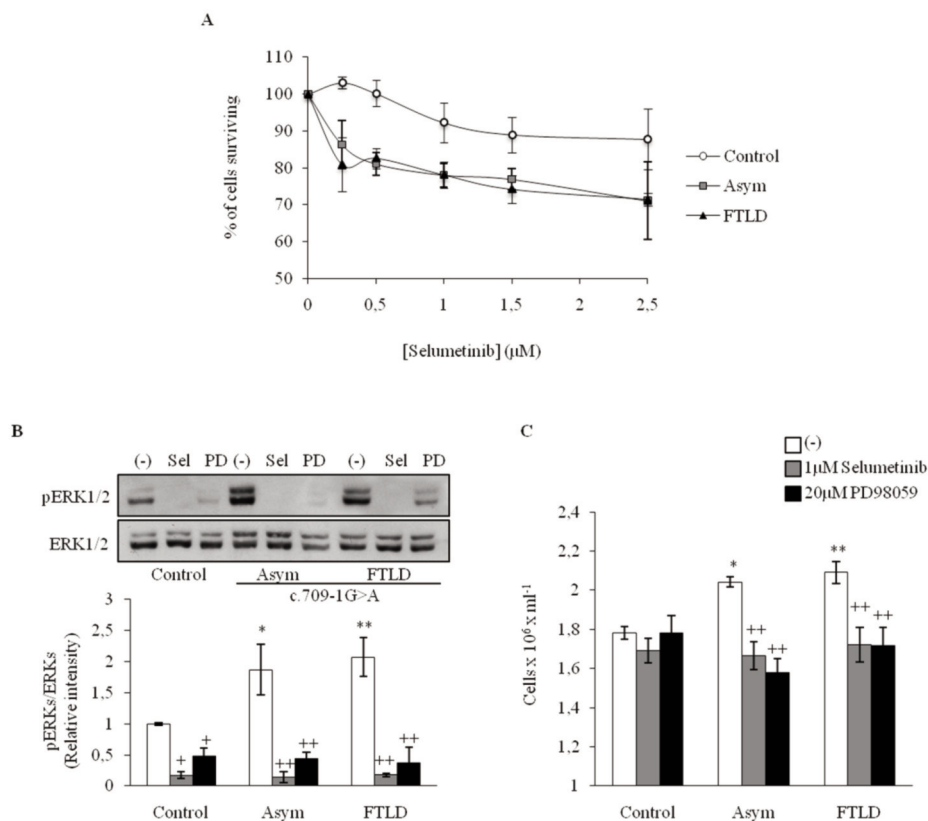


Figure 6

Effects of selumetinib on proliferation and ERK1/2 activation on lymphoblasts from control and c.709-1G>A *GRN* mutation carriers individuals

Immortalized lymphocytes from control and c.709-1G>A *GRN* mutation carriers were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$ and were incubated in medium containing 10% FBS. A: For the MTT assays, triplicates with 100,000 cells per well were seeded in absence or presence of increasing doses of selumetinib (0-2.5 μM) for 72 hours. Results represent the % of cell survival of treated cells referred to untreated ones. B: Efficacy of the selumetinib (1 μM) and PD98059 (20 μM) treatment in the inhibition of ERK1/2 activity. The densitometric data represent the mean \pm SEM of seven independent determinations carried out with different cell lines. C: Effect of the treatment with 1 μM selumetinib and 20 μM PD98059 on the proliferation of control and PGRN deficient lymphoblasts. Aliquots were taken for cell counting 72 hours after the drug administration. Data shown are the mean \pm SEM of seven determinations carried out with different cell lines. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ significantly different from control cells. + $p < 0.05$; ++ $p < 0.001$ significantly different from untreated cells.

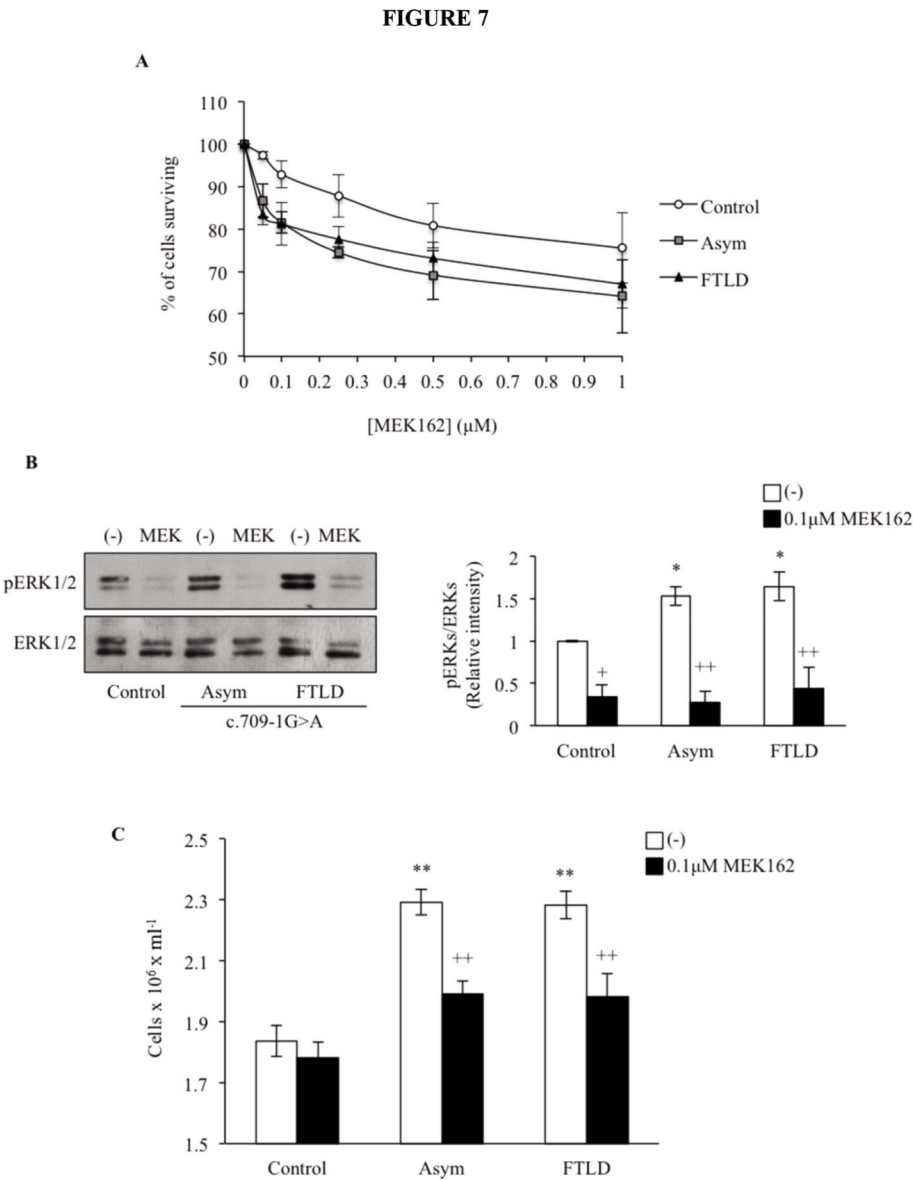


Figure 7

Effects of MEK162 on proliferation and ERK1/2 activation on lymphoblasts from control and c.709-1G>A *GRN* mutation carriers individuals

A: Cells were seeded in absence or presence of increasing doses of MEK162 (0-1 μM) and 72 hour later the MTT assay was performed. The experimental conditions were identical to those described in the legend of Fig. 6. Results represent the % of cell survival of treated cells referred to untreated ones. B: Efficacy of the treatment with 0.1 μM of MEK162 in the inhibition of ERK1/2 activity. The densitometric data represent the mean ± SEM of seven determinations carried out in cell extracts from different individuals. C: Proliferative activity of lymphoblast from control and *GRN* mutation carriers individuals 72 hours after the MEK162 (0.1 μM) treatment. Data shown are the mean ± SEM of seven determinations carried out with different cell lines, *p<0.05; **p<0.01 significantly different from control cells. +p<0.05; ++p<0.01 significantly different from untreated cells.

Targeting PGRN levels and ERK1/2 activity in peripheral cell from FTLD patients

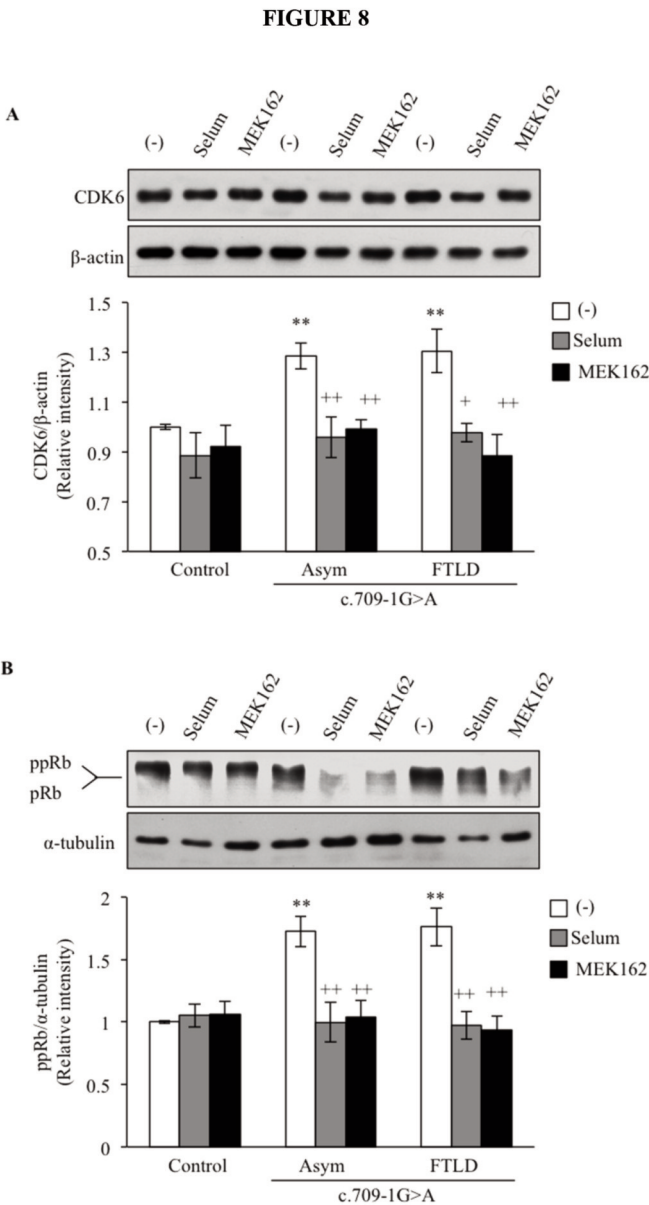


Figure 8

Effects of selumetinib and MEK162 on CDK6 levels and pRb phosphorylation status of lymphoblasts from control and c.709-1G>A *GRN* mutation carriers individuals.

Immortalized lymphocytes from control and *GRN* mutation carriers, asymptomatic or FTLD-TDP patients, were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$ and incubated in RPMI medium in presence or absence of selumetinib ($1 \mu\text{M}$) and MEK162 ($0.1 \mu\text{M}$). 24 hours after the treatment, cells were collected to prepare cell extracts for Western blotting. Representative immunoblots of CDK6 levels (A) and pRb status (B) are shown. Densitometric analyses represent the mean \pm SEM of different observations carried out in six cell lines from each group. ** $p < 0.01$ significantly different from control cells. + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$ significantly different from untreated cells

FIGURE 9

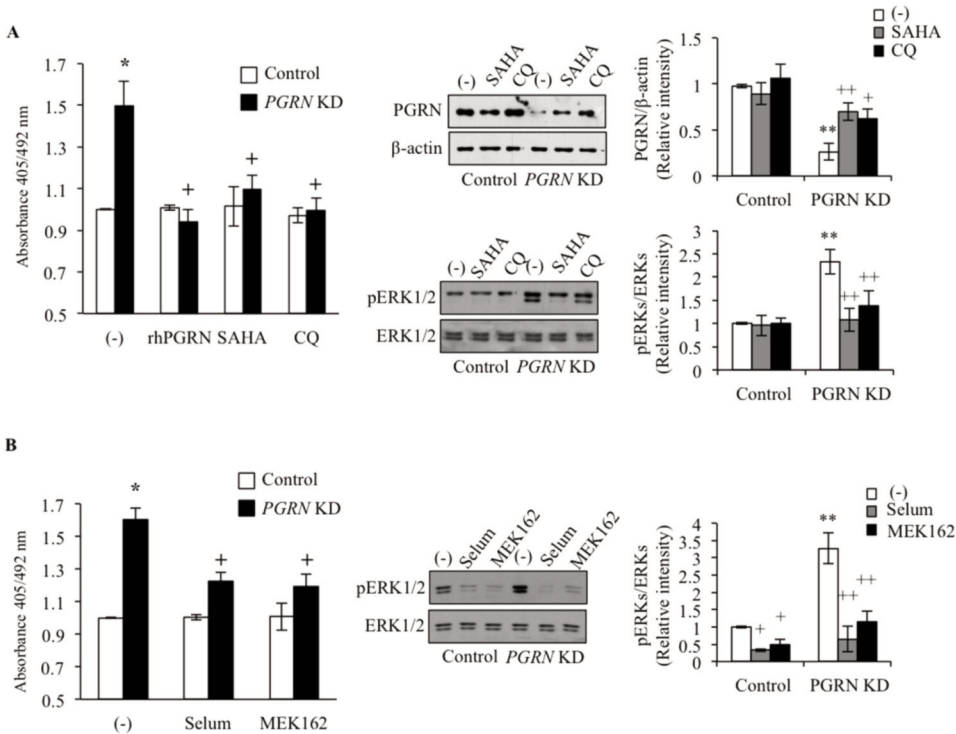


Figure 9

Effects of PGRN enhancers and ERK1/2 inhibitors on PGRN deficient neuroblastoma cells.

A: Control and KD PGRN SH-SY5Y cells (15000 cells/well) were incubated in the absence or in the presence of rhPGRN (100 ng/ml) SAHA (1 μ M) or CQ (10 μ M) for 24 hours. DNA synthesis was assessed by BrdU incorporation method according to the manufacturer's instructions. Proliferation was expressed as absorbance of stimulated minus that of non-stimulated cultures. Data shown are the mean \pm SEM for three individual experiments. 24 hours after drug administration, whole cell extracts of SH-SY5Y clones expressing either the control vector or a target sequence of human PGRN mRNA were prepared to analyze by Western blotting the expression of PGRN and pERK1/2. Densitometric analyses show the mean \pm SEM for four individual experiments. B: Effect of the treatment with selumetinib (1 μ M) and MEK162 (0.1 μ M) on the BrdU incorporation into DNA and in the activation of ERK1/2 in control and knockdown cells. Data shown are the mean \pm SEM for four individual experiments. *p<0.05; **p<0.01 significantly different from control cells. +p<0.05; ++p<0.01 significantly different from untreated cells.

5

Discusión

1

Mecanismos moleculares implicados en la regulación de la proliferación de linfoblastos de pacietes de DLFT-TDP

En este trabajo se ha considerado la posibilidad de que alteraciones en el control del ciclo celular pudieran jugar un papel relevante en la patogénesis de la DLFT-TDP. Numerosas evidencias sugieren que la activación de la maquinaria del ciclo celular en neuronas post-mitóticas puede contribuir a la pérdida neuronal y eventualmente a la neurodegeneración (Bialopiotrowicz, *et al.*, 2012, Costa, *et al.*, 2012, M.J. Chen, *et al.*, 2013, Herrup, *et al.*, 2004, Katsel, *et al.*, 2013, Morillo, *et al.*, 2012). Se han identificado alteraciones en el ciclo celular asociadas a varias enfermedades neurodegenerativas como la EA (Bialopiotrowicz, *et al.*, 2012, Seward, *et al.*, 2013), EP (Hoglinger, *et al.*, 2007), ELA (Appert-Collin, *et al.*, 2006) y también a la DLFT, donde sobre todo se han descrito alteraciones en el ciclo celular asociadas a la patología de tau (Husseman, *et al.*, 2000). Debido a que la aparición de estas enfermedades puede estar asociada a diferentes factores etiológicos, se cree que la activación del ciclo celular puede ser una respuesta a diferentes factores nocivos y que las alteraciones de proteínas relacionadas con el ciclo celular pueden ser un mecanismo convergente en la neurodegeneración.

En este trabajo hemos estudiado la respuesta celular a la estimulación por suero de linfoblastos derivados de individuos control y portadores de la mutación c.709-1G>A en el gen *GRN*, tanto asintomáticos como diagnosticados de DLFT-TDP. En trabajos previos de nuestro y otros laboratorios, se ha demostrado que los cambios en el ciclo celular relacionados con las enfermedades neurodegenerativas pueden ser detectados en tejidos no neuronales, como por ejemplo linfocitos de sangre periférica (Bartolome, *et al.*, 2010, de las Cuevas, *et al.*, 2003, Esteras, *et al.*, 2013, Munoz, *et al.*, 2008, Nagy, *et al.*, 2002, Zhou y Jia, 2010). Asimismo, demostramos que el proceso de de inmortalización de linfocitos de sangre periférica mediante la infección con el virus de Epstein-Barr no interfiere en la respuesta celular en condiciones de presencia o ausencia de suero (Bartolome, *et al.*, 2010, Esteras, *et al.*, 2013, Munoz, *et al.*, 2008). Además, diferentes evidencias indican que las líneas linfoblásticas resultantes tras el proceso de inmortalización expresan marcadores de activación y moléculas de adhesión similares a las de las células B activadas (Wang, *et al.*, 1990), y por esta razón han sido usadas con frecuencia como modelo experimental en estudios biológicos y médicos (Gibson y Huang, 2002, Jiang, *et al.*, 2013, Lopez-Atalaya, *et al.*,

2012, Stark y Dolan, 2013). Estas observaciones demuestran que las células periféricas de pacientes, fácilmente accesibles, son “herramientas” útiles para estudiar los mecanismos implicados en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas.

Nuestros resultados muestran que los linfoblastos procedentes de individuos portadores de la mutación c.709-1G>A presentan un incremento en su actividad proliferativa debido a alteraciones en algunas proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular. Los linfoblastos deficientes en PGRN muestran, por ejemplo, una disminución del número de células en fase G₁, un aumento de células en fase S y un incremento de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb). Esta proteína se encuentra controlando la progresión entre las fases G₁ y S del ciclo celular actuando como intermediaria entre las señales extracelulares y el proceso de transcripción en el núcleo (Hatakeyama y Weinberg, 1995). Cuando pRb se encuentra hipofosforilada, forma complejos inhibitorios con factores de transcripción de la familia de E2F (Chellappan, et al., 1991), pero cuando pRb se fosforila por la acción de ciclinas dependientes de kinasas (CDKs), se libera E2F y se favorece la transcripción de genes implicados en la progresión del ciclo celular (Helin, 1998). pRb es fosforilada secuencialmente por dos complejos diferentes de ciclinas/CDKs, el complejo ciclina D/CDK4/CDK6 y el complejo ciclina E/CDK2 (Mittnacht, 1998). Nuestros resultados indican que el aumento de la actividad proliferativa de los linfoblastos portadores de la mutación en *GRN* no se debe a diferencias en los niveles de expresión de ciclina D, ciclina E, CDK4 y CDK2. Sin embargo, sí que se observó un aumento en los niveles celulares de la proteína CDK6 en los linfoblastos deficientes en PGRN sin que se hayan detectado cambios en el contenido celular de los inhibidores específicos de los complejos ciclina/CDK (las familias Cip/Kip y INK4) que están controlando la progresión del ciclo celular (Csikasz-Nagy, et al., 2011, Grana y Reddy, 1995, Murray, 2004). En su conjunto, estos resultados nos permiten concluir que las alteraciones en el ciclo celular observadas en las células portadoras de la mutación c.709-1G>A en *GRN* pueden deberse al aumento de los niveles y actividad de la proteína CDK6, que a su vez es la encargada de fosforilar a pRb. Numerosas evidencias relacionan la alteración en el contenido de CDK6 y de su actividad kinasa con el au-

mento de la proliferación celular en ciertos tumores (Brito-Babapulle, *et al.*, 2002, Timmermann, *et al.*, 1997, Whiteway, *et al.*, 2013), además también se han detectado cambios en la actividad de CDK6 y pRb en algunos modelos celulares y animales de neurodegeneración (Greene, *et al.*, 2007, Nguyen, *et al.*, 2002, Stone, *et al.*, 2011).

Se ha descrito que la expresión de CDK6 se encuentra regulada por TDP-43 (Ayala, *et al.*, 2008a, Liu, *et al.*, 2012). Por un lado, Ayala y colaboradores describieron que la proteína TDP-43 actúa reprimiendo la transcripción de CDK6 (Ayala, *et al.*, 2008b) debido a su afinidad para unirse a las secuencias GT que se encuentran repetidas a lo largo de la secuencia de los intrones de CDK6, pero no de los intrones de los genes humanos que codifican para otras CDKs (Ayala, *et al.*, 2008a). Por otro lado, la capacidad de TDP-43 para unirse a un ARN no codificante de cadena larga, *gadd7* (del inglés, *growth-arrested DNA damage-inducible gene 7*), podría alterar la interacción de TDP-43 con CDK6, e inducir la degradación del mensajero (Liu, *et al.*, 2012), alterando así los niveles de CDK6 a nivel postranscripcional. Las observaciones realizadas en los linfoblastos portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN*, indican que el aumento de CDK6 está asociado a una disminución, pequeña pero significativa, en el contenido nuclear de TDP-43. Estos resultados están en consonancia con trabajos previos que indicaban que el déficit de PGRN alteraba el tránsito entre el núcleo y el citosol de TDP-43, dando lugar a un aumento en la presencia de esta proteína en el citosol (Dormann *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2007). En conjunto, nuestros resultados sugieren que la pérdida de una función de TDP-43, reprimiendo la expresión de CDK6, tras su salida del núcleo, podría explicar el aumento de los niveles de CDK6 y la actividad proliferativa de las células que portan la PGRN mutada. Este mecanismo parece más probable que una ganancia de función tóxica de los agregados de TDP-43 en el citosol celular. Dos publicaciones recientes apoyan esta idea, la primera de ellas indica que no existe correlación entre los agregados proteicos de TDP-43 y la severidad de la enfermedad (Vassall, *et al.*, 2011), mientras que la segunda sugiere que la función de la TDP-43 es importante para la supervivencia celular en la ELA (Igaz, *et al.*, 2011).

Nuestros resultados indican que no hay diferencias significativas en el aumento de

la actividad proliferativa de los linfoblastos portadores de la mutación c.709-1G>A independientemente de que procedan de individuos asintomáticos o diagnosticados de DLFT. Teniendo en cuenta que la mayoría de los portadores asintomáticos son más jóvenes que los pacientes, estos resultados podrían indicar que las alteraciones en el control del ciclo celular podrían ser manifestaciones tempranas de la enfermedad. En este sentido, se ha observado que el 37% de los portadores de la mutación muestran signos de la enfermedad a los 60 años, aumentando este porcentaje hasta el 87% en individuos en torno a los 70 años de edad (Moreno, *et al.*, 2009). Más recientemente, se han descrito alteraciones neuropsicológicas leves (Barandiaran, *et al.*, 2012) y un sutil adelgazamiento de la corteza cerebral en los portadores asintomáticos de la mutación c.709-1G>A (Moreno, *et al.*, 2013). No obstante, hemos observado que algunos de los individuos asintomáticos, portadores de la mutación c.709-1G>A, siguen sin presentar sintomatología de la enfermedad a edades avanzadas, lo que sugiere que algunos factores ambientales o genéticos pueden determinar la edad de aparición de los síntomas de la enfermedad.

En resumen, tal y como se representa esquemáticamente en la figura 16, nuestros resultados indican que la pérdida de la función nuclear de TDP-43, asociada a su salida hacia el citosol podría estar relacionada con el aumento de la expresión de CDK6, hiperfosforilación de pRb y aumento de la proliferación de los linfoblastos deficientes en PGRN. Asumiendo que los fallos en el ciclo celular observados pudieran ser signos periféricos de la enfermedad, nuestros resultados sugieren que las neuronas de los individuos portadores de la mutación c.709-1G>A presentan el riesgo de una entrada aberrante en el ciclo celular que les causaría la muerte. Este hecho sugiere que el bloqueo del ciclo celular podría ser una posible diana terapéutica en el tratamiento de la DLFT asociada a mutaciones en *GRN*.

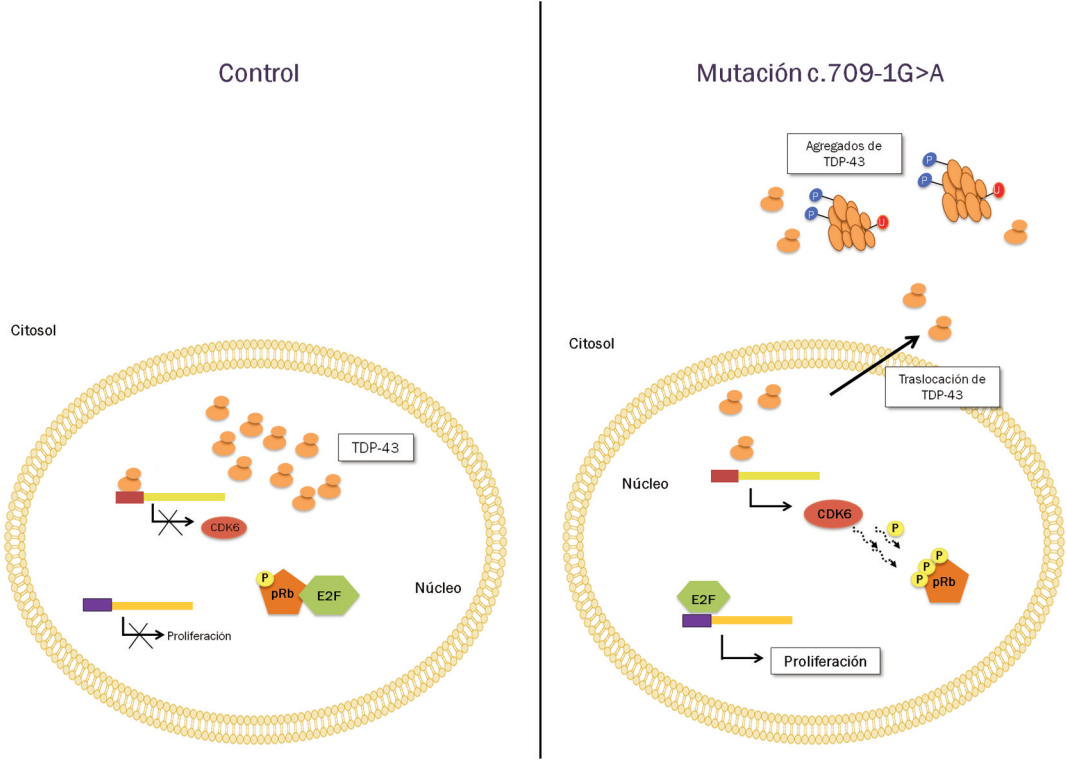


Fig. 16. Esquema representativo del efecto de la mutación c.709-1G>A en los mecanismos de proliferación/supervivencia celular: La haploinsuficiencia de PGRN está relacionada con la pérdida de la función nuclear de TDP-43 y consecuente activación de CDK6/pRb que finalmente lleva a la expresión de genes relacionados con la proliferación celular.

2

Control de la supervivencia/muerte celular en linfoblastos portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN*

El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio comparativo de la vulnerabilidad frente al estrés inducido por la privación del suero de los linfoblastos portadores de la mutación c.709-1G>A en el gen *GRN* (procedentes de individuos asintomáticos o diagnosticados de DLFT-TDP) y donantes control. Nuestros resultados demuestran que los linfoblastos portadores de dicha mutación, deficientes en PGRN, son más resistentes a la muerte celular inducida por la retirada del suero que los linfoblastos que proceden de individuos sanos. Como acabamos de discutir, estas células presentan también una respuesta proliferativa exacerbada, por tanto, las características de estas células se asemejan a la de las células tumorales, y podrían ser manifestaciones sistémicas de la reentrada en ciclo celular de las neuronas en áreas selectivas del cerebro de individuos aquejados de enfermedades neurodegenerativas (Appert-Collin, *et al.*, 2006, Hernandez-Ortega, *et al.*, 2011, Hoglinger, *et al.*, 2007, L. Li, *et al.*, 2011). El hecho de que en trabajos previos de distintos laboratorios, incluido el nuestro, se haya demostrado que las células extraneurales procedentes de individuos con alzhéimer presentan una alteración selectiva de los mecanismos de regulación supervivencia/muerte (Bartolome, *et al.*, 2007, Eckert, *et al.*, 2001, Naderi, *et al.*, 2006, Uberti, *et al.*, 2002) apoya el uso de las líneas linfoblásticas procedentes de pacientes para el estudio de los mecanismos moleculares que controlan la decisión celular supervivencia/muerte asociada al proceso neurodegenerativo.

La muerte celular puede ocurrir por necrosis o apoptosis. La muerte por apoptosis presenta unas características morfológicas y bioquímicas propias que la hacen fácilmente distinguible de la necrosis. En este trabajo estudiamos las características de la muerte celular inducida por la ausencia de suero mediante diferentes técnicas como el análisis por citometría de flujo del contenido de ADN celular, el examen microscópico de los núcleos marcados con DAPI, el estudio de la dependencia y actividad de las caspasas ejecutoras 3 y 7, el análisis del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta \psi$) y midiendo la salida del citocromo c desde la mitocondria al citosol. Los resultados obtenidos nos permitieron concluir que la muerte celular inducida por la retirada del suero presenta características de apoptosis y que la haploinsuficiencia de PGRN podría estar protegiendo a las células de pacientes de DLFT a la muerte celular programada, ya que la adición de PGRN exógena

sensibilizaba a los linfoblastos deficientes en PGRN a la muerte celular inducida por la retirada del suero.

La mayor resistencia de las células procedentes de individuos portadores de la mutación c.709-1G>A a la muerte inducida por la retirada del suero, se acompañaba de un aumento en la expresión y niveles de la proteína CDK6 y de un incremento en la fosforilación de pRb. Por tanto, parece que la activación de la vía de señalización CDK6/pRb en linfoblastos deficientes en PGRN, juega un papel protector frente a la apoptosis. Esta afirmación se apoya también en la observación de que la adición de inhibidores de la expresión de CDK6, como el butirato de sodio, o de su actividad, como PD332991 (Guha, 2013), es capaz de restaurar la respuesta normal en los linfoblastos portadores de la mutación en GRN, sensibilizando las células al efecto pro-apoptótico de la privación del suero. Es interesante mencionar que los efectos de butirato de sodio y el PD332991 en la supervivencia de los linfoblastos portadores de la mutación c.709-1G>A son similares a los descritos en otros tipos celulares, por ejemplo la adición de PD332991 fue capaz de aumentar la sensibilidad de las células de mieloma a la apoptosis inducida por el bortezomib (Menu, *et al.*, 2008) y se ha descrito que el butirato de sodio puede promover la apoptosis en células de cáncer de próstata (J. Kim, *et al.*, 2007, Qiu, *et al.*, 2012).

El aumento en la actividad de CDK6/pRb, asociada a la mayor resistencia a la muerte inducida por la privación del suero que presentan los linfoblastos deficientes en PGRN, contrasta con el hecho de que se ha descrito un aumento de esta vía en modelos animales y celulares de neurodegeneración (Gallinari, *et al.*, 2007, Greene, *et al.*, 2007). Sin embargo, hay que tener en cuenta que las alteraciones en el control del ciclo celular pueden tener consecuencias distintas en linfoblastos que en cerebro. Los linfocitos de individuos portadores de la mutación c.709-1G>A presentan una mayor actividad proliferativa y mayor resistencia a la muerte celular inducida por la retirada del suero que los linfoblastos de individuos controles. Sin embargo, se ha descrito que las alteraciones relacionadas con el ciclo celular que se producen en neuronas adultas inducen la disfunción y muerte neuronal (Herrup, *et al.*, 2004). Es importante resaltar que el tratamiento de células deficientes en PGRN con inhibidores de CDK6 permite restaurar la “respuesta normal” a la estimula-

ción por suero o a su retirada, disminuyendo la proliferación celular y sensibilizando las células al efecto pro-apoptótico de la privación del suero. En ambos casos, los inhibidores de CDK6 disminuyen los niveles de fosforilación de pRb de las células portadoras de la mutación hasta niveles comparables a los de células control. En conjunto, nuestros resultados revelan un papel clave de CDK6/pRb en el control de la decisión celular, supervivencia/muerte, dependiendo de la disponibilidad de factores tróficos. Queda por demostrar si los inhibidores de CDK6 pueden proteger también a las neuronas del cerebro de los pacientes de DLFT modulando la ruta de señalización CDK6/pRb. Se ha sugerido que el butirato de sodio, al igual que otros inhibidores de las HDAC pueden tener un efecto neuroprotector (Langley, *et al.*, 2005, Zhang, *et al.*, 2012), además diferentes evidencias muestran que estos compuestos prolongan la supervivencia de cultivos de neuronas corticales (Jeong, *et al.*, 2003), promueven el crecimiento neuronal y estudios *in vivo* han demostrado que estas drogas protegen a las neuronas del daño isquémico (Kim, *et al.*, 2007) y tienen efectos neuroprotectores en modelos animales de neurodegeneración (Jia, *et al.*, 2012, Murphy, *et al.*, 2013, Ricobaraza, *et al.*, 2012). Estas evidencias, junto con el hecho de que ambos inhibidores de CDK6 están siendo usados para el tratamiento de algunos tumores humanos con buena tolerancia (Bose, *et al.*, 2013, Dickson, *et al.*, 2013, Gallinari, *et al.*, 2007, Hille, *et al.*, 2008), sugieren que pueden ser usados en el tratamiento de la DLFT.

El efecto pro-apoptótico del butirato de sodio en las células portadoras de la mutación en *GRN* parece estar directamente relacionado con la haploinsuficiencia de *PGRN*, ya que su efecto es similar al que produce la administración de *PGRN* recombinante. El hecho de que la *PGRN* exógena mimetice los efectos de butirato sódico pero incrementa los del inhibidor de la actividad de CDK6 (PD332991) en la supervivencia celular nos hace pensar que la alteración de la transcripción de CDK6 es el factor fundamental en el control de los procesos de supervivencia y muerte celular en la DLFT.

Nuestros resultados no permiten conocer con exactitud la causa de la diferente vulnerabilidad frente a la retirada del suero de los linfoblastos control y los portadores de la mutación en *GRN*. Sin embargo, cabe pensar que puede ser debido a alguna alteración en

receptores celulares o moléculas de señalización. En este sentido, se han descrito alteraciones en los niveles circulantes de algunas citoquinas en el suero de individuos portadores de mutaciones en *GRN*, tanto asintomáticos como diagnosticados de DLFT (Bossu, *et al.*, 2011). Por otro lado, en un estudio reciente de genómica funcional se han encontrado cambios en la señalización vía Wnt (Wingless/Int) en células deficientes en PGRN, junto con un aumento en los niveles del receptor FZD2 en un ratón deficiente en PGRN (Rosen, *et al.*, 2011). Por otra parte, se ha propuesto que la PGRN puede unirse al receptor 2 (TNFR2) del factor de necrosis tumoral TNF α (Tang, *et al.*, 2011), lo que ha llevado a pensar que la haploinsuficiencia de PGRN podría potenciar los efectos de la señalización mediada por TNF α , aunque existe controversia sobre la veracidad de este mecanismo ya que un trabajo reciente no muestra evidencias de esta interacción entre PGRN y TNFR (X. Chen, *et al.*, 2013).

Finalmente, hay que discutir que aunque los cambios detectados en células periféricas de pacientes de DLFT-TDP, no son directamente extrapolables a lo que sucede en el cerebro, es evidente que bajo un daño neuronal también hay alteraciones periféricas asociados a la enfermedad. Se ha descrito una estrecha relación entre el estado del sistema inmune, particularmente de los linfocitos, y algunas enfermedades neurodegenerativas como la EA (Gladkevich, *et al.*, 2004). Que nosotros conozcamos, no se han descrito cambios en el sistema inmune en pacientes de DLFT, pero no se puede descartar la posibilidad de que algunos factores, como por ejemplo citoquinas neuroinflamatorias, que comunican el sistema inmune y el SNC puedan influir en la supervivencia neuronal en la DLFT.

En resumen, en este trabajo se presentan evidencias experimentales que indican que la activación exacerbada de la vía CDK6/pRb en células deficientes en PGRN está asociada con la disminución de la vulnerabilidad celular frente a la ausencia de factores tróficos. Tanto la administración de PGRN exógena como los inhibidores de CDK6 permiten normalizar la respuesta de los linfoblastos deficientes en PGRN. Estas observaciones nos permiten sugerir que la inhibición de CDK6 o alternatively, la modulación de los niveles de PGRN pudieran ser eficaces en el tratamiento de la DLFT-TDP.

3

Papel de la vía WNT5a en el control de proliferación de linfoblastos portadores de la mutación en *GRN* c.709-1G>A

En este trabajo quisimos estudiar la influencia del déficit de PGRN en las principales vías de señalización relacionadas con el control de la proliferación celular. La conclusión obtenida de este estudio es que la haploinsuficiencia de PGRN podría estar relacionada con el aumento de la actividad de la vía no canónica de señalización mediada por Wnt5a. Esta observación está en consonancia con los resultados obtenidos recientemente en un análisis de la regulación transcripcional mediada por Wnt, utilizando la tecnología de GWAS (*Genome-wide association study*) (Wexler, et al., 2011). En este trabajo se describió que los niveles de PGRN y de Wnt dependen recíprocamente unos de los otros, sugiriendo por tanto, un vínculo entre la señalización vía Wnt y la DLFT-TDP. Además, se han descrito alteraciones de la ruta de señalización de Wnt en otras enfermedades neurodegenerativas como ELA (Chen, et al., 2012, Tury, et al., 2013), EA (da Cruz e Silva, et al., 2010, Silva-Alvarez, et al., 2013) y EP (Berwick y Harvey, 2012, Berwick y Harvey, 2013, L'Episcopo, et al., 2012).

Nuestros resultados indican que la ruta Wnt5a está sobreactivada en los linfoblastos portadores de la mutación c.709-1G>A. Esta afirmación se apoya en diferentes evidencias experimentales. En primer lugar, los linfoblastos portadores de la mutación en *GRN* presentaban niveles más altos de Wnt5a, intracelular y secretada, que los individuos control. En segundo lugar, la adición de Wnt5a exógena o del medio condicionado de los linfoblastos deficientes en PGRN a las células control fue capaz de incrementar tanto su actividad proliferativa como los niveles de la proteína CDK6 hasta niveles similares a los encontrados en las células deficientes en PGRN. Finalmente el bloqueo de la activación de Wnt5a, usando un anticuerpo específico, normalizó la actividad proliferativa de los linfoblastos portadores de la mutación.

El papel de Wnt5a en la proliferación celular es complejo. Se ha descrito que Wnt5a es capaz de incrementar la proliferación en el células de glioblastoma humano (Yu, et al., 2007), fibroblastos (Vuga, et al., 2009) y células de cáncer de pulmón (Huang, et al., 2010) además de promover la linfopoyesis de las células B en cultivos de células de médula ósea (Malhotra, et al., 2008). Sin embargo, hay evidencias de que también puede inhibir la pro-

liferación de linfocitos B (Liang, *et al.*, 2003) y melanocitos (Zhang, *et al.*, 2013). En base a estos estudios, se puede concluir que el papel de Wnt5a regulando la proliferación depende del tipo celular.

En este trabajo hemos observado que los linfoblastos portadores de la mutación c.709-1G>A presentan niveles más altos de Wnt5a, asociados con un aumento de la actividad proliferativa, independientemente de que hayan sido diagnosticados o no de DLFT, lo que sugiere que la sobreestimulación de la señalización de Wnt5a es un evento temprano en el desarrollo de la enfermedad.

El uso de inhibidores selectivos de las principales vías de señalización celular implicadas en el control de proliferación, nos ha permitido identificar que Wnt5a señala a través de la cascada $G_{\alpha i}$ -PLC-PKC-ERK1/2. El aumento de la proliferación de las células deficientes en PGRN desaparece en presencia de toxina pertussis (PT). Además, la PT es capaz de impedir el efecto de la administración exógena de Wnt5a en la estimulación de la proliferación de células procedentes de individuos control. Esta observación está en concordancia con algunos trabajos que indicaban que la estimulación por Wnt5a depende de la activación de proteínas heterotriméricas $G_{\alpha i}$ en células de mamíferos (Halleskog, *et al.*, 2012, Jung, *et al.*, 2013, Kilander, *et al.*, 2011, Wilson, *et al.*, 2010). Por otro lado, nuestros resultados indican que la deficiencia de PGRN activa la ruta no canónica de Wnt5a, como muestra la estimulación de la actividad de la proteína kinasa dependiente de calmodulina (CaMKII), determinada indirectamente por los niveles de fosforilación de la proteína, o la activación de Proteína Kinasa C (PKC) en los linfoblastos portadores de la mutación en GRN. Además, la adición de los inhibidores específicos de CaMKII y PKC, KN-62 y GF109203X respectivamente, fue capaz de bloquear el aumento de proliferación observado en las células deficientes en PGRN. Nuestros resultados parecen indicar que la activación de la ruta no canónica de Wnt5a en los linfoblastos portadores de la mutación c.709-1G>A lleva finalmente a la sobreactivación de la vía MAPK/ERK1/2 (*Mitogen-Activated Protein Kinases*, o proteínas kinasas activadas por mitógenos). Estos resultados son similares a los obtenidos en otros trabajos previos en los que se había descrito que Wnt5a era capaz

de incrementar la proliferación celular a través de la activación de ERK1/2, de manera dependiente de $G_{\alpha i}$, en células de la microglía (Halleskog, *et al.*, 2012).

Nuestros resultados no permiten determinar el mecanismo molecular por el que ERK1/2 regula la expresión y la actividad kinasa de CDK6 en linfoblastos deficientes en PGRN. Como ya se ha descrito en apartados anteriores, los linfoblastos portadores de la mutación c.709-1G>A presentan un mayor contenido citosólico de TDP-43 acompañado de una pérdida de TDP-43 nuclear. En un trabajo reciente, se ha descrito que la ruta MAPK/ERK1/2 puede jugar un papel importante en la pérdida nuclear y acumulación citosólica de TDP-43 en respuesta al estrés (Parker, *et al.*, 2012). Estos hechos nos llevan a especular que el aumento de los niveles de CDK6 y proliferación celular asociados a la activación de ERK1/2 observados en linfoblastos portadores de la mutación en PGRN pueden estar relacionados con la salida de TDP-43 del núcleo.

En resumen, como muestra la figura 17, en este trabajo presentamos evidencias de que la haploinsuficiencia de PGRN aumenta de forma aberrante la señalización no canónica de Wnt5a de un modo dependiente de proteínas $G_{\alpha i}$ heterotriméricas. La sobreactivación de esta ruta llevaría a la activación de ERK1/2 que sería la responsable del aumento de proliferación observado en los linfoblastos procedentes de individuos portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN* asociada con DLFT.

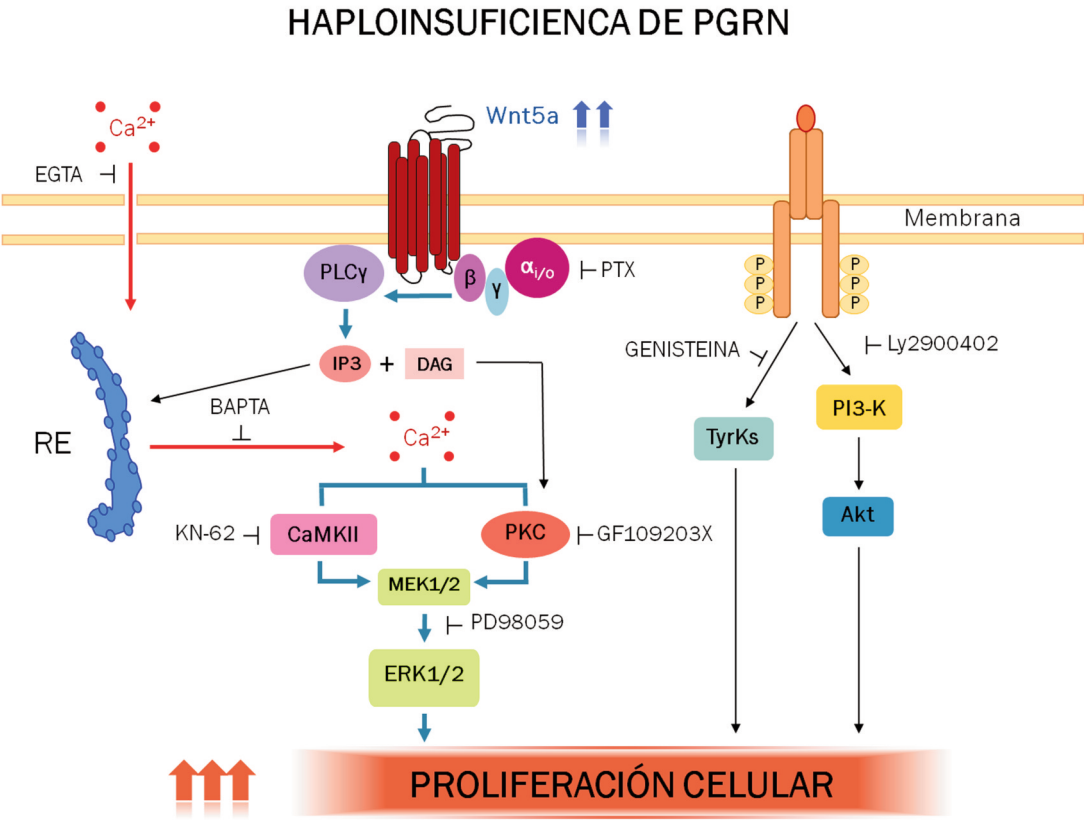


Fig. 17. Esquema de las rutas de señalización alteradas por la haploinsuficiencia de PGRN. Se muestra que el déficit de PGRN está incrementando la señalización no canónica de Wnt5a de un modo dependiente de proteínas G_{αi}-PLC-PKC-ERK1/2 que finalmente lleva al aumento de la proliferación celular.

En relación a la extrapolación de estos resultados al sistema nervioso, conviene destacar la estrecha relación que parece existir entre el estado del sistema inmune, particularmente de los linfocitos, y algunas enfermedades neurodegenerativas como la EA (Gladkevich, *et al.*, 2004). Diferentes evidencias relacionan la activación de la vía de señalización Wnt con la patogénesis de diferentes enfermedades neurodegenerativas a través de la modulación de la respuesta neuroinflamatoria (Marchetti y Pluchino, 2013), por ejemplo se ha relacionado la activación de la señalización no canónica de Wnt5a con la neuroinflamación asociada a la EA (B. Li, *et al.*, 2011) y también a la EP a través de la neurogénesis y neuroprotección de neuronas dopaminérgicas (Episcopo, *et al.*, 2013). Nuestros resultados indican que la señalización de Wnt5a también se encuentra alterada en células de neuroblastoma SH-SY5Y tras el silenciamiento del gen *GRN*. Por tanto, cabe imaginar que algunas citoquinas neuroinflamatorias, que relacionan los sistemas inmune y nervioso, pudieran regular la supervivencia neuronal en la DLFT.

En conclusión, asumiendo que la deficiencia de PGRN y las alteraciones del ciclo celular mediadas por Wnt5a pudieran ser signos periféricos de la enfermedad, nuestros resultados sugieren que la vía Wnt5a juega un papel crítico en la patogénesis de la DLFT asociada a mutaciones en *GRN*, por lo que esta vía podría ser una diana importante en el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de la enfermedad.

4

Búsqueda de nuevas aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la DLFT asociada a mutaciones en *GRN*

El término DLFT designa un conjunto de enfermedades neurodegenerativas muy heterogéneo, tanto en su presentación clínica como en su perfil genético y características neuropatológicas. En los últimos años, se ha avanzado considerable en el conocimiento de las bases moleculares de la DLFT, y aunque hasta el momento no existen tratamientos aprobados, el conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen tras la patología de la DLFT han proporcionado las bases para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad. La haploinsuficiencia de PGRN, la identificación de TDP-43 como el principal componente de las inclusiones patogénicas asociadas a las mutaciones en *GRN* y el descubrimiento de nuevas rutas de señalización implicadas en la patología de la DLFT abren nuevas perspectivas para la identificación de dianas moleculares y el diseño de nuevas terapias para el tratamiento de la DLFT-TDP.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los linfoblastos portadores de la mutación c.709-1G>A, que causa haploinsuficiencia de PGRN, presentan una respuesta proliferativa exacerbada asociada a una sobreactivación de la ruta de señalización MAPK/ERK1/2. Al igual que sucede en otras enfermedades neurodegenerativas, las alteraciones en el control del ciclo celular que muestran estas células de pacientes de DLFT se han considerado un reflejo de una reactivación indeseada del ciclo celular en neuronas vulnerables del cerebro de los individuos afectados (Arendt, 2012, Herrup y Yang, 2007, Hogglinger, *et al.*, 2007, Ueberham, *et al.*, 2012). Este hecho, junto con la demostración de que el proceso de transformación viral no altera la respuesta de los linfocitos a la estimulación por suero (Bartolome, *et al.*, 2010, Munoz, *et al.*, 2008), justifica el uso de linfocitos inmortalizados de pacientes e individuos control para el estudio pre-clínico de la eficacia de potenciales tratamientos.

Teniendo en cuenta nuestros resultados previos en los que se identificaba una sobreactivación de la ruta CDK6/pRb mediada por MAPK/ERK1/2, como responsable del incremento de la actividad proliferativa de linfoblastos deficientes en PGRN, en este trabajo nos propusimos investigar los efectos de compuestos capaces de aumentar los niveles de PGRN o de inhibir ERK1/2 en la actividad proliferativa de linfoblastos portadores de la mu-

tación c.709-1G>A y células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en las que previamente se había silenciado el gen *GRN*. Para ello tratamos las células con Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA), Vorinostat, un inhibidor de HDAC capaz de incrementar la expresión de *GRN* (Cenik, *et al.*, 2011) o con cloroquina (CQ), un compuesto capaz de incrementar los niveles de PGRN de un modo post-traducciona (Capell, *et al.*, 2011). Por otro lado, usamos los inhibidores selectivos de MEK1/2, selumetinib (AZD6244) y MEK162 (ARRY-438162) (Akinleye, *et al.*, 2013, Yeh, *et al.*, 2007). Nuestros resultados indican que ninguno de estos compuestos es tóxico a la dosis elegida y todos ellos fueron capaces de inhibir la proliferación celular de un modo dependiente de la dosis. Los efectos en la inhibición de la proliferación celular fueron más evidentes en los linfoblastos portadores de la mutación en *GRN*.

SAHA y CQ fueron capaces de bloquear la sobreestimulación de la actividad proliferativa de los linfoblastos portadores de la mutación c.709-1G>A. El efecto de ambas drogas inhibiendo la proliferación está asociado con el aumento de los niveles de PGRN. Además, se ha podido observar que los efectos de estas drogas sobre la proliferación celular, en las células portadoras de la mutación en *GRN*, son similares a los observados tras el tratamiento con PGRN exógena. Nuestros resultados indican que es la progranulina completa y no las granulinas maduras, la responsable del efecto inhibitorio de la proliferación, ya que pudimos observar que la adición de PGRN exógena previamente tratada con elastasa no fue capaz de revertir el exceso de proliferación de los linfoblastos portadores de la mutación en *GRN*.

Nuestros resultados sugieren que el mecanismo molecular que subyace a la inhibición de la proliferación en los linfoblastos deficientes el PGRN tras el tratamiento con SAHA y CQ, es la capacidad de estos compuestos de impedir la estimulación de ERK1/2 tras la adición de suero, que resulta en la disminución de los niveles de CDK6 y la fosforilación de pRb, elementos clave en el control de la transición G₁/S del ciclo celular.

El hecho de que se haya descrito el potencial terapéutico de SAHA y CQ en otras enfermedades neurodegenerativas (Hockly, *et al.*, 2003, Kazantsev y Thompson, 2008, Solomon y Lee, 2009, Ververis y Karagiannis, 2011) nos lleva a pensar que estas drogas pueden ser útiles para el tratamiento de la DLFT asociada a la haploinsuficiencia de PGRN. Por otro lado, un estudio reciente demostró que el tratamiento con SAHA era capaz de inducir cambios en marcadores inflamatorios en un modelo de choque séptico de ratón (Finkelshtein, *et al.*, 2010). Esta evidencia sugiere que este compuesto puede tener efectos secundarios beneficiosos para la DLFT, por ejemplo en la neuroinflamación, además de normalizar la deficiencia de PGRN.

La vía MAPK/ERK1/2 es una ruta de transducción de señales que se encuentra frecuentemente desregulada en diferentes enfermedades entre las que se encuentran muchos de los cánceres humanos, haciendo de esta cascada una diana atractiva para la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de la DLFT (Kono, *et al.*, 2006). Basándonos en resultados previos que mostraban una sobreestimulación de ERK1/2 asociada con la activación de CDK6/pRb en linfoblastos deficientes en PGRN, cabía pensar que la administración de inhibidores selectivos de esta ruta, también impedirían la respuesta proliferativa exacerbada de las células portadoras de la mutación c.709-1G>A. Por esta razón, hemos estudiado el efecto de selumetinib y MEK162 en la proliferación de las células deficientes en PGRN. Ambas drogas son moléculas pequeñas, de administración oral, que actúan como inhibidores selectivos (no competitivos con ATP) de MEK1/2 (Akinleye, *et al.*, 2013). Se han llevado a cabo ensayos clínicos en los que se ha estudiado la tolerabilidad y posibles efectos secundarios de estas drogas en el tratamiento de diferentes tipos de tumores en humanos. En un estudio de tolerabilidad en fase I (Adjei, *et al.*, 2008) se determinaron algunas de las posibles reacciones tóxicas asociadas a la administración de selumetinib, entre las que se encontraban erupciones cutáneas, diarrea, náuseas y fatiga. El compuesto MEK162 también ha sido evaluado en diferentes estudios clínicos que se encuentran en fase I y II para el tratamiento de diferentes tumores sólidos mostrando unas reacciones tóxicas similares al selumetinib (Ascierto, *et al.*, 2013). En las células de-

ficientes en PGRN, la inhibición de la actividad de ERK1/2 tras el tratamiento con selumetinib y MEK162 fue capaz de restaurar los niveles de CDK6 y la proliferación celular hasta valores similares a los observados en las células control.

Volviendo a la relevancia patofisiológica de nuestros resultados, es importante destacar que los efectos de estos compuestos en células de neuroblastoma SH-SY5Y en las que se había silenciado el gen *GRN*, fueron similares a los encontrados en los linfoblastos portadores de la mutación c.709-1G>A. Tras el tratamiento con SAHA y CQ, las células de neuroblastoma deficientes en PGRN presentaron una reducción de incorporación de BrdU en el ADN asociada a una inhibición de la sobreactivación de ERK1/2. Resultados similares en la incorporación de BrdU se obtuvieron tras el tratamiento con los inhibidores de MEK1/2. Tomando juntas estas observaciones, podemos concluir que el uso de células periféricas de pacientes, en concreto linfoblastos inmortalizados con el virus de Epstein-Barr, puede ser un modelo útil para el estudio de la DLFT y de los efectos de posibles terapias para el tratamiento de la enfermedad. Además, teniendo en cuenta que se ha demostrado que todos los compuestos usados en este trabajo (SAHA, CQ, selumetinib y MEK162) son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica (Ascierto, *et al.*, 2013, Hirata, *et al.*, 2011, Matsuoka y Yang, 2012, Palmieri, *et al.*, 2009) y que han mostrado tener un potencial terapéutico beneficioso en el tratamiento de diferentes enfermedades, podemos concluir que las drogas usadas en este trabajo podrían ser usadas en el tratamiento de la DLFT asociada a mutaciones en *GRN*.



Conclusiones

Conclusiones

- 1.- Los linfoblastos procedentes de individuos portadores de la mutación c.709-1G>A en el gen de *GRN* (asintomáticos o diagnosticados de DLFT) presentan una mayor capacidad proliferativa y son más resistentes a la apoptosis inducida por la retirada del suero que los linfoblastos procedentes de individuos control.
- 2.- Hemos identificado que la actividad de CDK6/pRb es el factor clave que regula el destino celular supervivencia/muerte en función de la disponibilidad de factores tróficos. Por tanto, esta vía podría considerarse como una nueva diana terapéutica para el tratamiento de la DLFT.
- 3.- El aumento de la expresión y actividad de CDK6 en los linfoblastos deficientes en PGRN se asocia con la salida del núcleo de la proteína TDP-43 y la consecuente pérdida de su función inhibitoria de la transcripción de CDK6.
- 4.- Las alteraciones observadas en los mecanismos de proliferación/muerte celular asociadas a la haploinsuficiencia de PGRN parecen anticiparse a la aparición de los síntomas de la enfermedad, ya que se observan también en individuos asintomáticos portadores de la mutación c.709-1G>A.
- 5.- Nuestros resultados indican que la haploinsuficiencia de PGRN está relacionada con un aumento de la ruta de señalización celular no canónica de Wnt5a, probablemente debido a un incremento, intra y extracelular, de los niveles de Wnt5a.
- 6.- Wnt5a señala a través de la cascada $G_{\alpha i}$ -PLC-PKC-ERK1/2 que finalmente lleva a la sobreactivación de CDK6/pRb y de la actividad proliferativa de los linfoblastos portadores de la mutación en *GRN*.

- 7.- El silenciamiento de *GRN* en líneas celulares de neuroblastoma SH-SY5Y resulta en un incremento de la estimulación de la señalización de Wnt5a, alteraciones en la actividad de ERK1/2 y proliferación celular. Estas observaciones apoyan la idea de que la DLFT tiene, como otras enfermedades neurodegenerativas, manifestaciones a nivel sistémico.
- 8.- El tratamiento con drogas que aumentan los niveles de PGRN o que inhiben ERK1/2 es capaz de normalizar la repuesta de linfoblastos y células de neuroblastoma deficientes en PGRN. Estos resultados sugieren que estas estrategias farmacológicas pueden ser útiles para el tratamiento de la DLFT asociada al déficit de PGRN
- 9.- Aunque nuestros resultados no son directamente extrapolables al SNC, debido a su actividad antiproliferativa, las drogas usadas en esta tesis pueden tener un efecto neuroprotector en el cerebro de pacientes de DLFT, impidiendo que las neuronas vulnerables atraviesen el punto crítico G₁/S de control del ciclo celular.
- 10.- Por último, pensamos que los resultados de esta tesis, obtenidos en células extraneuronales fácilmente accesibles, aportan algunas claves al estudio de la patogénesis de la DLFT asociada a mutaciones en *GRN* y ponen de manifiesto el interés de este tipo de células para la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

Bibliografía



Bibliografía

- Adjei, A.A., Cohen, R.B., Franklin, W., Morris, C., Wilson, D., Molina, J.R., Hanson, L.J., Gore, L., Chow, L., Leong, S., Maloney, L., Gordon, G., Simmons, H., Marlow, A., Litwiler, K., Brown, S., Poch, G., Kane, K., Haney, J., Eckhardt, S.G. 2008. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral, small-molecule mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) in patients with advanced cancers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26(13), 2139-46. doi:10.1200/jco.2007.14.4956.
- Ahmed, Z., Mackenzie, I.R., Hutton, M.L., Dickson, D.W. 2007. Progranulin in frontotemporal lobar degeneration and neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation* 4, 7. doi:10.1186/1742-2094-4-7.
- Ahmed, Z., Sheng, H., Xu, Y.F., Lin, W.L., Innes, A.E., Gass, J., Yu, X., Wuertzer, C.A., Hou, H., Chiba, S., Yamanouchi, K., Leissring, M., Petrucelli, L., Nishihara, M., Hutton, M.L., McGowan, E., Dickson, D.W., Lewis, J. 2010. Accelerated lipofuscinosis and ubiquitination in granulin knockout mice suggest a role for progranulin in successful aging. *The American journal of pathology* 177(1), 311-24. doi:10.2353/ajpath.2010.090915.
- Akinleye, A., Furqan, M., Mukhi, N., Ravella, P., Liu, D. 2013. MEK and the inhibitors: from bench to bedside. *Journal of hematology & oncology* 6, 27. doi:10.1186/1756-8722-6-27.
- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G.M., Cooper, N.R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B.L., Finch, C.E., Frautschy, S., Griffin, W.S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I.R., McGeer, P.L., O'Banion, M.K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F.L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G., Wyss-Coray, T. 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 21(3), 383-421.
- Almeida, S., Gascon, E., Tran, H., Chou, H.J., Gendron, T.F., Degroot, S., Tapper, A.R., Sellier, C., Charlet-Berguerand, N., Karydas, A., Seeley, W.W., Boxer, A.L., Petrucelli, L., Miller, B.L., Gao, F.B. 2013. Modeling key pathological features of frontotemporal dementia with C9ORF72 repeat expansion in iPSC-derived human neurons. *Acta neuropathologica* 126(3), 385-99. doi:10.1007/s00401-013-1149-y.
- Almeida, S., Zhang, Z., Coppola, G., Mao, W., Futai, K., Karydas, A., Geschwind, M.D., Tartaglia, M.C., Gao, F., Gianni, D., Sena-Esteves, M., Geschwind, D.H., Miller, B.L., Farese, R.V., Jr., Gao, F.B. 2012. Induced pluripotent stem cell models of progranulin-deficient frontotemporal dementia uncover specific reversible neuronal defects. *Cell reports* 2(4), 789-98. doi:10.1016/j.celrep.2012.09.007.
- Almeida, S., Zhou, L., Gao, F.B. 2011. Progranulin, a glycoprotein deficient in frontotemporal dementia, is a novel substrate of several protein disulfide isomerase family proteins. *PloS one* 6(10), e26454. doi:10.1371/journal.pone.0026454.
- Alonso, A., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. 2001. Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(12), 6923-8. doi:10.1073/pnas.121119298.
- Alonso Adel, C., Mederlyova, A., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. 2004. Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *The Journal of biological chemistry* 279(33), 34873-81. doi:10.1074/jbc.M405131200.

- Amelio, I., Melino, G., Knight, R.A. 2011. Cell death pathology: cross-talk with autophagy and its clinical implications. *Biochemical and biophysical research communications* 414(2), 277-81. doi:10.1016/j.bbrc.2011.09.080.
- Ameur, A., Zaghlool, A., Halvardson, J., Wetterbom, A., Gyllenstein, U., Cavelier, L., Feuk, L. 2011. Total RNA sequencing reveals nascent transcription and widespread co-transcriptional splicing in the human brain. *Nature structural & molecular biology* 18(12), 1435-40. doi:10.1038/nsmb.2143.
- Andersen, J.K. 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature medicine* 10 Suppl, S18-25. doi:10.1038/nrn1434.
- Anokye-Danso, F., Trivedi, C.M., Juhr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P.J., Epstein, J.A., Morrissey, E.E. 2011. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell stem cell* 8(4), 376-88. doi:10.1016/j.stem.2011.03.001.
- Appert-Collin, A., Hugel, B., Levy, R., Niederhoffer, N., Coupin, G., Lombard, Y., Andre, P., Poindron, P., Gies, J.P. 2006. Cyclin dependent kinase inhibitors prevent apoptosis of postmitotic mouse motoneurons. *Life sciences* 79(5), 484-90. doi:10.1016/j.lfs.2006.01.032.
- Arai, T., Hasegawa, M., Nonaka, T., Kametani, F., Yamashita, M., Hosokawa, M., Niizato, K., Tsuchiya, K., Kobayashi, Z., Ikeda, K., Yoshida, M., Onaya, M., Fujishiro, H., Akiyama, H. 2010. Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLD and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 30(2), 170-81. doi:10.1111/j.1440-1789.2009.01089.x.
- Arendt, T. 2012. Cell cycle activation and aneuploid neurons in Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology* 46(1), 125-35. doi:10.1007/s12035-012-8262-0.
- Arendt, T., Rodel, L., Gartner, U., Holzer, M. 1996. Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 7(18), 3047-9.
- Arvanitakis, Z. 2010. Update on frontotemporal dementia. *The neurologist* 16(1), 16-22. doi:10.1097/NRL.0b013e3181b1d5c6.
- Ascierto, P.A., Schadendorf, D., Berking, C., Agarwala, S.S., van Herpen, C.M., Queirolo, P., Blank, C.U., Hauschild, A., Beck, J.T., St-Pierre, A., Niazi, F., Wandel, S., Peters, M., Zubel, A., Dummer, R. 2013. MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. *The lancet oncology* 14(3), 249-56. doi:10.1016/s1470-2045(13)70024-x.
- Ash, P.E., Zhang, Y.J., Roberts, C.M., Saldi, T., Hutter, H., Buratti, E., Petrucelli, L., Link, C.D. 2010. Neurotoxic effects of TDP-43 overexpression in *C. elegans*. *Human molecular genetics* 19(16), 3206-18. doi:10.1093/hmg/ddq230.
- Aswathy, P.M., Jairani, P.S., Mathuranath, P.S. 2010. Genetics of frontotemporal lobar degeneration. *Annals of Indian Academy of Neurology* 13(Suppl 2), S55-62. doi:10.4103/0972-2327.74246.

- Ayala, Y.M., Misteli, T., Baralle, F.E. 2008a. TDP-43 regulates retinoblastoma protein phosphorylation through the repression of cyclin-dependent kinase 6 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(10), 3785-9. doi:10.1073/pnas.0800546105.
- Ayala, Y.M., Zago, P., D'Ambrogio, A., Xu, Y.F., Petrucelli, L., Buratti, E., Baralle, F.E. 2008b. Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *Journal of cell science* 121(Pt 22), 3778-85. doi:10.1242/jcs.038950.
- Babst, M., Katzmann, D.J., Estepa-Sabal, E.J., Meerloo, T., Emr, S.D. 2002. Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Developmental cell* 3(2), 271-82.
- Badadani, M., Nalbandian, A., Watts, G.D., Vesa, J., Kitazawa, M., Su, H., Tanaja, J., Dec, E., Wallace, D.C., Mukherjee, J., Caiozzo, V., Warman, M., Kimonis, V.E. 2010. VCP associated inclusion body myopathy and paget disease of bone knock-in mouse model exhibits tissue pathology typical of human disease. *PloS one* 5(10). doi:10.1371/journal.pone.0013183.
- Baechtold, H., Kuroda, M., Sok, J., Ron, D., Lopez, B.S., Akhmedov, A.T. 1999. Human 75-kDa DNA-pairing protein is identical to the pro-oncoprotein TLS/FUS and is able to promote D-loop formation. *The Journal of biological chemistry* 274(48), 34337-42.
- Bagnoli, S., Piaceri, I., Tedde, A., Piacentini, S., Nannucci, S., Bracco, L., Sorbi, S., Nacmias, B. 2012. Progranulin genetic screening in frontotemporal lobar degeneration patients from central Italy. *Cellular and molecular neurobiology* 32(1), 13-6. doi:10.1007/s10571-011-9741-y.
- Bai, Q., Burton, E.A. 2011. Zebrafish models of Tauopathy. *Biochimica et biophysica acta* 1812(3), 353-63. doi:10.1016/j.bbdis.2010.09.004.
- Baker, M., Litvan, I., Houlden, H., Adamson, J., Dickson, D., Perez-Tur, J., Hardy, J., Lynch, T., Bigio, E., Hutton, M. 1999. Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. *Human molecular genetics* 8(4), 711-5.
- Baker, M., Mackenzie, I.R., Pickering-Brown, S.M., Gass, J., Rademakers, R., Lindholm, C., Snowden, J., Adamson, J., Sadvnick, A.D., Rollinson, S., Cannon, A., Dwosh, E., Neary, D., Melquist, S., Richardson, A., Dickson, D., Berger, Z., Eriksen, J., Robinson, T., Zehr, C., Dickey, C.A., Crook, R., McGowan, E., Mann, D., Boeve, B., Feldman, H., Hutton, M. 2006. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 442(7105), 916-9. doi:10.1038/nature05016.
- Banzhaf-Strathmann J, C.R., Mücke O, Rentzsch K, van der Zee J, Engelborghs S, Peter P De Deyn, Cruts M, van Broeckhoven C, Plass C, Edbauer D. 2013. Promoter DNA methylation regulates progranulin expression and is altered in FTLD. *Acta Neuropathologica Communications* 1:16 (13 May 2013).
- Barandiaran, M., Estanga, A., Moreno, F., Indakoetxea, B., Alzualde, A., Balluerka, N., Marti Masso, J.F., de Munain, A.L. 2012. Neuropsychological features of asymptomatic c.709-1G>A progranulin mutation carriers. *Journal of the International Neuropsychological Society : JINS* 18(6), 1086-90. doi:10.1017/s1355617712000823.

- Barmada, S.J., Finkbeiner, S. 2010. Pathogenic TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: disease-associated pathways. *Reviews in the neurosciences* 21(4), 251-72.
- Barmada, S.J., Skibinski, G., Korb, E., Rao, E.J., Wu, J.Y., Finkbeiner, S. 2010. Cytoplasmic mislocalization of TDP-43 is toxic to neurons and enhanced by a mutation associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(2), 639-49. doi:10.1523/jneurosci.4988-09.2010.
- Bartolome, F., de Las Cuevas, N., Munoz, U., Bermejo, F., Martin-Requero, A. 2007. Impaired apoptosis in lymphoblasts from Alzheimer's disease patients: cross-talk of Ca²⁺/calmodulin and ERK1/2 signaling pathways. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64(11), 1437-48. doi:10.1007/s00018-007-7081-3.
- Bartolome, F., Munoz, U., Esteras, N., Alquezar, C., Collado, A., Bermejo-Pareja, F., Martin-Requero, A. 2010. Simvastatin overcomes the resistance to serum withdrawal-induced apoptosis of lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67(24), 4257-68. doi:10.1007/s00018-010-0443-2.
- Bartolome, F., Munoz, U., Esteras, N., Esteban, J., Bermejo-Pareja, F., Martin-Requero, A. 2009. Distinct regulation of cell cycle and survival in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *International journal of clinical and experimental pathology* 2(4), 390-8.
- Bateman, A., Belcourt, D., Bennett, H., Lazure, C., Solomon, S. 1990. Granulins, a novel class of peptide from leukocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 173(3), 1161-8.
- Bei, H., Ross, L., Neuhaus, J., Knopman, D., Kramer, J., Boeve, B., Caselli, R.J., Graff-Radford, N., Mendez, M.F., Miller, B.L., Boxer, A.L. 2010. Off-label medication use in frontotemporal dementia. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias* 25(2), 128-33. doi:10.1177/1533317509356692.
- Bellingham, M.C. 2011. A review of the neural mechanisms of action and clinical efficiency of riluzole in treating amyotrophic lateral sclerosis: what have we learned in the last decade? *CNS neuroscience & therapeutics* 17(1), 4-31. doi:10.1111/j.1755-5949.2009.00116.x.
- Belly, A., Moreau-Gachelin, F., Sadoul, R., Goldberg, Y. 2005. Delocalization of the multifunctional RNA splicing factor TLS/FUS in hippocampal neurones: exclusion from the nucleus and accumulation in dendritic granules and spine heads. *Neuroscience letters* 379(3), 152-7. doi:10.1016/j.neulet.2004.12.071.
- Bensimon, G., Lacomblez, L., Meininger, V. 1994. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *The New England journal of medicine* 330(9), 585-91. doi:10.1056/nejm199403033300901.
- Bentmann, E., Haass, C., Dormann, D. 2013. Stress granules in neurodegeneration - lessons learnt from TAR DNA binding protein of 43 kDa and fused in sarcoma. *The FEBS journal* 280(18), 4348-70. doi:10.1111/febs.12287.

- Benussi, L., Rossi, G., Glionna, M., Tonoli, E., Piccoli, E., Fostinelli, S., Paterlini, A., Flocco, R., Albani, D., Pantieri, R., Cereda, C., Forloni, G., Tagliavini, F., Binetti, G., Ghidoni, R. 2013. C9ORF72 Hexanucleotide Repeat Number in Frontotemporal Lobar Degeneration: A Genotype-Phenotype Correlation Study. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. doi:10.3233/jad-131028.
- Berger, Z., Ravikumar, B., Menzies, F.M., Oroz, L.G., Underwood, B.R., Pangalos, M.N., Schmitt, I., Wullner, U., Evert, B.O., O'Kane, C.J., Rubinshtein, D.C. 2006. Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Human molecular genetics* 15(3), 433-42. doi:10.1093/hmg/ddi458.
- Bernardi, L., Tomaino, C., Anfossi, M., Gallo, M., Geracitano, S., Costanzo, A., Colao, R., Puccio, G., Frangipane, F., Curcio, S.A., Mirabelli, M., Smirne, N., Iapalo, D., Maletta, R.G., Bruni, A.C. 2009. Novel PSEN1 and PGRN mutations in early-onset familial frontotemporal dementia. *Neurobiology of aging* 30(11), 1825-33. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.01.005.
- Berwick, D.C., Harvey, K. 2012. The importance of Wnt signalling for neurodegeneration in Parkinson's disease. *Biochemical Society transactions* 40(5), 1123-8. doi:10.1042/bst20120122.
- Berwick, D.C., Harvey, K. 2013. The regulation and deregulation of Wnt signalling by PARK genes in health and disease. *Journal of molecular cell biology*. doi:10.1093/jmcb/mjt037.
- Bhandari, V., Bateman, A. 1992. Structure and chromosomal location of the human granulin gene. *Biochemical and biophysical research communications* 188(1), 57-63.
- Bhardwaj, A., Myers, M.P., Buratti, E., Baralle, F.E. 2013. Characterizing TDP-43 interaction with its RNA targets. *Nucleic acids research* 41(9), 5062-74. doi:10.1093/nar/gkt189.
- Bhaskar, K., Konerth, M., Kokiko-Cochran, O.N., Cardona, A., Ransohoff, R.M., Lamb, B.T. 2010. Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor. *Neuron* 68(1), 19-31. doi:10.1016/j.neuron.2010.08.023.
- Bialopiotrowicz, E., Szybinska, A., Kuzniewska, B., Buizza, L., Uberti, D., Kuznicki, J., Wojda, U. 2012. Highly pathogenic Alzheimer's disease presenilin 1 P117R mutation causes a specific increase in p53 and p21 protein levels and cell cycle dysregulation in human lymphocytes. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 32(2), 397-415. doi:10.3233/jad-2012-121129.
- Bigni, B., Premi, E., Pilotto, A., Padovani, A., Borroni, B. 2012. Disease-modifying therapies in frontotemporal lobar degeneration. *Current medicinal chemistry* 19(7), 1008-20.
- Bosco, D.A., Lemay, N., Ko, H.K., Zhou, H., Burke, C., Kwiatkowski, T.J., Jr., Sapp, P., McKenna-Yasek, D., Brown, R.H., Jr., Hayward, L.J. 2010. Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. *Human molecular genetics* 19(21), 4160-75. doi:10.1093/hmg/ddq335.
- Bose, J.K., Huang, C.C., Shen, C.K. 2011. Regulation of autophagy by neuropathological protein TDP-43. *The Journal of biological chemistry* 286(52), 44441-8. doi:10.1074/jbc.M111.237115.
- Bose, P., Simmons, G.L., Grant, S. 2013. Cyclin-dependent kinase inhibitor therapy for hematologic malignancies. *Expert opinion on investigational drugs* 22(6), 723-38. doi:10.1517/13543784.2013.789859.

- Bossu, P., Salani, F., Alberici, A., Archetti, S., Bellelli, G., Galimberti, D., Scarpini, E., Spalletta, G., Caltagirone, C., Padovani, A., Borroni, B. 2011. Loss of function mutations in the progranulin gene are related to pro-inflammatory cytokine dysregulation in frontotemporal lobar degeneration patients. *Journal of neuroinflammation* 8, 65. doi:10.1186/1742-2094-8-65.
- Bowen, D.M., Procter, A.W., Mann, D.M., Snowden, J.S., Esiri, M.M., Neary, D., Francis, P.T. 2008. Imbalance of a serotonergic system in frontotemporal dementia: implication for pharmacotherapy. *Psychopharmacology* 196(4), 603-10. doi:10.1007/s00213-007-0992-8.
- Boxer, A.L., Boeve, B.F. 2007. Frontotemporal dementia treatment: current symptomatic therapies and implications of recent genetic, biochemical, and neuroimaging studies. *Alzheimer disease and associated disorders* 21(4), S79-87. doi:10.1097/WAD.0b013e31815c345e.
- Boxer, A.L., Lipton, A.M., Womack, K., Merrilees, J., Neuhaus, J., Pavlic, D., Gandhi, A., Red, D., Martin-Cook, K., Svetlik, D., Miller, B.L. 2009. An open-label study of memantine treatment in 3 subtypes of frontotemporal lobar degeneration. *Alzheimer disease and associated disorders* 23(3), 211-7. doi:10.1097/WAD.0b013e318197852f.
- Boya, P., Kroemer, G. 2009. Beclin 1: a BH3-only protein that fails to induce apoptosis. *Oncogene* 28(21), 2125-7. doi:10.1038/onc.2009.83.
- Boyault, C., Zhang, Y., Fritah, S., Caron, C., Gilquin, B., Kwon, S.H., Garrido, C., Yao, T.P., Vourc'h, C., Matthias, P., Khochbin, S. 2007. HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. *Genes & development* 21(17), 2172-81. doi:10.1101/gad.436407.
- Boyd, J.D., Lee-Armandt, J.P., Feiler, M.S., Zauur, N., Liu, M., Kraemer, B., Concannon, J.B., Ebata, A., Wolozin, B., Glicksman, M.A. 2013. A High-Content Screen Identifies Novel Compounds That Inhibit Stress-Induced TDP-43 Cellular Aggregation and Associated Cytotoxicity. *Journal of biomolecular screening*. doi:10.1177/1087057113501553.
- Brandt, R., Gergou, A., Wacker, I., Fath, T., Hutter, H. 2009. A *Caenorhabditis elegans* model of tau hyperphosphorylation: induction of developmental defects by transgenic overexpression of Alzheimer's disease-like modified tau. *Neurobiology of aging* 30(1), 22-33. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.05.011.
- Braun, R.J., Zischka, H. 2008. Mechanisms of Cdc48/VCP-mediated cell death: from yeast apoptosis to human disease. *Biochimica et biophysica acta* 1783(7), 1418-35. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.01.015.
- Brito-Babapulle, V., Gruszka-Westwood, A.M., Platt, G., Andersen, C.L., Elnenaei, M.O., Matutes, E., Wotherspoon, A.C., Weston-Smith, S.G., Catovsky, D. 2002. Translocation t(2;7)(p12;q21-22) with dysregulation of the CDK6 gene mapping to 7q21-22 in a non-Hodgkin's lymphoma with leukemia. *Haematologica* 87(4), 357-62.
- Brun, A. 1987. Frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type. I. Neuropathology. *Archives of gerontology and geriatrics* 6(3), 193-208.
- Brun, A., Passant, U. 1996. Frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type. Structural characteristics, diag-

- nostic criteria and relation to other frontotemporal dementias. *Acta neurologica Scandinavica Supplementum* 168, 28-30.
- Brunden, K.R., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. 2009. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nature reviews Drug discovery* 8(10), 783-93. doi:10.1038/nrd2959.
- Brunden, K.R., Yao, Y., Potuzak, J.S., Ferrer, N.I., Ballatore, C., James, M.J., Hogan, A.M., Trojanowski, J.Q., Smith, A.B., 3rd, Lee, V.M. 2011. The characterization of microtubule-stabilizing drugs as possible therapeutic agents for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 63(4), 341-51. doi:10.1016/j.phrs.2010.12.002.
- Buchan, J.R., Parker, R. 2009. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Molecular cell* 36(6), 932-41. doi:10.1016/j.molcel.2009.11.020.
- Bulic, B., Pickhardt, M., Mandelkow, E. 2013. Progress and developments in tau aggregation inhibitors for Alzheimer disease. *Journal of medicinal chemistry* 56(11), 4135-55. doi:10.1021/jm3017317.
- Bulic, B., Pickhardt, M., Schmidt, B., Mandelkow, E.M., Waldmann, H., Mandelkow, E. 2009. Development of tau aggregation inhibitors for Alzheimer's disease. *Angew Chem Int Ed Engl* 48(10), 1740-52. doi:10.1002/anie.200802621.
- Buratti, E., Baralle, F.E. 2001. Characterization and functional implications of the RNA binding properties of nuclear factor TDP-43, a novel splicing regulator of CFTR exon 9. *The Journal of biological chemistry* 276(39), 36337-43. doi:10.1074/jbc.M104236200.
- Buratti, E., Baralle, F.E. 2008. Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13, 867-78.
- Buratti, E., De Conti, L., Stuani, C., Romano, M., Baralle, M., Baralle, F. 2010. Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels. *The FEBS journal* 277(10), 2268-81. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07643.x.
- Caceres, A., Potrebic, S., Kosik, K.S. 1991. The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11(6), 1515-23.
- Cagnin, A., Rossor, M., Sampson, E.L., Mackinnon, T., Banati, R.B. 2004. In vivo detection of microglial activation in frontotemporal dementia. *Annals of neurology* 56(6), 894-7. doi:10.1002/ana.20332.
- Cairns, N.J., Bigio, E.H., Mackenzie, I.R., Neumann, M., Lee, V.M., Hatanpaa, K.J., White, C.L., 3rd, Schneider, J.A., Grinberg, L.T., Halliday, G., Duyckaerts, C., Lowe, J.S., Holm, I.E., Tolnay, M., Okamoto, K., Yokoo, H., Murayama, S., Woulfe, J., Munoz, D.G., Dickson, D.W., Ince, P.G., Trojanowski, J.Q., Mann, D.M. 2007a. Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta neuropathologica* 114(1), 5-22. doi:10.1007/s00401-007-0237-2.
- Cairns, N.J., Neumann, M., Bigio, E.H., Holm, I.E., Troost, D., Hatanpaa, K.J., Foong, C., White, C.L., 3rd, Schneider,

- J.A., Kretschmar, H.A., Carter, D., Taylor-Reinwald, L., Paulsmeyer, K., Strider, J., Gitcho, M., Goate, A.M., Morris, J.C., Mishra, M., Kwong, L.K., Stieber, A., Xu, Y., Forman, M.S., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., Mackenzie, I.R. 2007b. TDP-43 in familial and sporadic frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin inclusions. *The American journal of pathology* 171(1), 227-40. doi:10.2353/ajpath.2007.070182.
- Camins, A., Pallas, M., Silvestre, J.S. 2008. Apoptotic mechanisms involved in neurodegenerative diseases: experimental and therapeutic approaches. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* 30(1), 43-65. doi:10.1358/mf.2008.30.1.1090962.
- Capell, A., Liebscher, S., Fellerer, K., Brouwers, N., Willem, M., Lammich, S., Gijssels, I., Bittner, T., Carlson, A.M., Sasse, F., Kunze, B., Steinmetz, H., Jansen, R., Dormann, D., Sleegers, K., Cruts, M., Herms, J., Van Broeckhoven, C., Haass, C. 2011. Rescue of progranulin deficiency associated with frontotemporal lobar degeneration by alkalizing reagents and inhibition of vacuolar ATPase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31(5), 1885-94. doi:10.1523/jneurosci.5757-10.2011.
- Carrasquillo, M.M., Nicholson, A.M., Finch, N., Gibbs, J.R., Baker, M., Rutherford, N.J., Hunter, T.A., DeJesus-Hernandez, M., Bisceglia, G.D., Mackenzie, I.R., Singleton, A., Cookson, M.R., Crook, J.E., Dillman, A., Hernandez, D., Petersen, R.C., Graff-Radford, N.R., Younkin, S.G., Rademakers, R. 2010. Genome-wide screen identifies rs646776 near sortilin as a regulator of progranulin levels in human plasma. *American journal of human genetics* 87(6), 890-7. doi:10.1016/j.ajhg.2010.11.002.
- Cassel, J.A., Reitz, A.B. 2013. Ubiquitin-2 (UBQLN2) binds with high affinity to the C-terminal region of TDP-43 and modulates TDP-43 levels in H4 cells: characterization of inhibition by nucleic acids and 4-aminoquinolines. *Biochimica et biophysica acta* 1834(6), 964-71. doi:10.1016/j.bbapap.2013.03.020.
- Catalgol, B., Grune, T. 2012. Proteasome and neurodegenerative diseases. *Progress in molecular biology and translational science* 109, 397-414. doi:10.1016/b978-0-12-397863-9.00011-0.
- Cenik, B., Sephton, C.F., Dewey, C.M., Xian, X., Wei, S., Yu, K., Niu, W., Coppola, G., Coughlin, S.E., Lee, S.E., Dries, D.R., Almeida, S., Geschwind, D.H., Gao, F.B., Miller, B.L., Farese, R.V., Jr., Posner, B.A., Yu, G., Herz, J. 2011. Suberoylanilide hydroxamic acid (vorinostat) up-regulates progranulin transcription: rational therapeutic approach to frontotemporal dementia. *The Journal of biological chemistry* 286(18), 16101-8. doi:10.1074/jbc.M110.193433.
- Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R.A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A.K., Beibel, M., Staufenbiel, M., Jucker, M., Goedert, M., Tolnay, M. 2009. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nature cell biology* 11(7), 909-13. doi:10.1038/ncb1901.
- Colombrita, C., Zennaro, E., Fallini, C., Weber, M., Sommacal, A., Buratti, E., Silani, V., Ratti, A. 2009. TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *Journal of neurochemistry* 111(4), 1051-61. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06383.x.
- Combs, B., Gamblin, T.C. 2012. FTDP-17 tau mutations induce distinct effects on aggregation and microtubule interactions. *Biochemistry* 51(43), 8597-607. doi:10.1021/bi3010818.

- Copani, A., Uberti, D., Sortino, M.A., Bruno, V., Nicoletti, F., Memo, M. 2001. Activation of cell-cycle-associated proteins in neuronal death: a mandatory or dispensable path? *Trends in neurosciences* 24(1), 25-31.
- Costa, V., Esposito, R., Aprile, M., Ciccodicola, A. 2012. Non-coding RNA and pseudogenes in neurodegenerative diseases: "The (un)Usual Suspects". *Frontiers in genetics* 3, 231. doi:10.3389/fgene.2012.00231.
- Couto, B., Manes, F., Montanes, P., Matallana, D., Reyes, P., Velasquez, M., Yoris, A., Baez, S., Ibanez, A. 2013. Structural neuroimaging of social cognition in progressive non-fluent aphasia and behavioral variant of frontotemporal dementia. *Frontiers in human neuroscience* 7, 467. doi:10.3389/fnhum.2013.00467.
- Cribbs, D.H., Poon, W.W., Rissman, R.A., Blurton-Jones, M. 2004. Caspase-mediated degeneration in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology* 165(2), 353-5. doi:10.1016/s0002-9440(10)63302-0.
- Crowe, A., Ballatore, C., Hyde, E., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. 2007. High throughput screening for small molecule inhibitors of heparin-induced tau fibril formation. *Biochemical and biophysical research communications* 358(1), 1-6. doi:10.1016/j.bbrc.2007.03.056.
- Crozat, A., Aman, P., Mandahl, N., Ron, D. 1993. Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. *Nature* 363(6430), 640-4. doi:10.1038/363640a0.
- Cruts, M., Gijselinck, I., van der Zee, J., Engelborghs, S., Wils, H., Pirici, D., Rademakers, R., Vandenberghe, R., Dermaut, B., Martin, J.J., van Duijn, C., Peeters, K., Sciot, R., Santens, P., De Pooter, T., Mattheijssens, M., Van den Broeck, M., Cuijt, I., Vennekens, K., De Deyn, P.P., Kumar-Singh, S., Van Broeckhoven, C. 2006. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* 442(7105), 920-4. doi:10.1038/nature05017.
- Cruz, M., Marinho, V., Fontenelle, L.F., Engelhardt, E., Laks, J. 2008. Topiramate may modulate alcohol abuse but not other compulsive behaviors in frontotemporal dementia: case report. *Cognitive and behavioral neurology : official journal of the Society for Behavioral and Cognitive Neurology* 21(2), 104-6. doi:10.1097/WNN.0b013e31816bdf73.
- Csikasz-Nagy, A., Palmisano, A., Zamborszky, J. 2011. Molecular network dynamics of cell cycle control: transitions to start and finish. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 761, 277-91. doi:10.1007/978-1-61779-182-6_19.
- Cuervo, A.M. 2004. Autophagy: in sickness and in health. *Trends in cell biology* 14(2), 70-7. doi:10.1016/j.tcb.2003.12.002.
- Cui, D.R., Wang, L., Jiang, W., Qi, A.H., Zhou, Q.H., Zhang, X.L. 2013. Propofol prevents cerebral ischemia-triggered autophagy activation and cell death in the rat hippocampus through the NF-kappaB/p53 signaling pathway. *Neuroscience* 246, 117-32. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.04.054.
- Cushman, M., Johnson, B.S., King, O.D., Gitler, A.D., Shorter, J. 2010. Prion-like disorders: blurring the divide between transmissibility and infectivity. *Journal of cell science* 123(Pt 8), 1191-201. doi:10.1242/jcs.051672.
- Custer, S.K., Neumann, M., Lu, H., Wright, A.C., Taylor, J.P. 2010. Transgenic mice expressing mutant forms

- VCP/p97 recapitulate the full spectrum of IBMPFD including degeneration in muscle, brain and bone. *Human molecular genetics* 19(9), 1741-55. doi:10.1093/hmg/ddq050.
- Czarnecki, K., Kumar, N., Josephs, K.A. 2008. Parkinsonism and tardive antecollis in frontotemporal dementia—increased sensitivity to newer antipsychotics? *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 15(2), 199-201. doi:10.1111/j.1468-1331.2007.02032.x.
- Chellappan, S.P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J.M., Nevins, J.R. 1991. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 65(6), 1053-61.
- Chen-Plotkin, A.S., Geser, F., Plotkin, J.B., Clark, C.M., Kwong, L.K., Yuan, W., Grossman, M., Van Deerlin, V.M., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. 2008. Variations in the progranulin gene affect global gene expression in frontotemporal lobar degeneration. *Human molecular genetics* 17(10), 1349-62. doi:10.1093/hmg/ddn023.
- Chen-Plotkin, A.S., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. 2010. TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease. *Nature reviews Neurology* 6(4), 211-20. doi:10.1038/nrneurol.2010.18.
- Chen, M.J., Ng, J.M., Peng, Z.F., Manikandan, J., Yap, Y.W., Llanos, R.M., Beart, P.M., Cheung, N.S. 2013. Gene profiling identifies commonalities in neuronal pathways in excitotoxicity: evidence favouring cell cycle re-activation in concert with oxidative stress. *Neurochemistry international* 62(5), 719-30. doi:10.1016/j.neuint.2012.12.015.
- Chen, X., Chang, J., Deng, Q., Xu, J., Nguyen, T.A., Martens, L.H., Cenik, B., Taylor, G., Hudson, K.F., Chung, J., Yu, K., Yu, P., Herz, J., Farese, R.V., Jr., Kukar, T., Tansey, M.G. 2013. Progranulin does not bind tumor necrosis factor (TNF) receptors and is not a direct regulator of TNF-dependent signaling or bioactivity in immune or neuronal cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33(21), 9202-13. doi:10.1523/jneurosci.5336-12.2013.
- Chen, Y., Guan, Y., Zhang, Z., Liu, H., Wang, S., Yu, L., Wu, X., Wang, X. 2012. Wnt signaling pathway is involved in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis in adult transgenic mice. *Neurological research* 34(4), 390-9. doi:10.1179/1743132812y.0000000027.
- Chen, Y., Yang, M., Deng, J., Chen, X., Ye, Y., Zhu, L., Liu, J., Ye, H., Shen, Y., Li, Y., Rao, E.J., Fushimi, K., Zhou, X., Bigio, E.H., Mesulam, M., Xu, Q., Wu, J.Y. 2011. Expression of human FUS protein in *Drosophila* leads to progressive neurodegeneration. *Protein & cell* 2(6), 477-86. doi:10.1007/s13238-011-1065-7.
- Cherra, S.J., 3rd, Chu, C.T. 2008. Autophagy in neuroprotection and neurodegeneration: A question of balance. *Future neurology* 3(3), 309-23. doi:10.2217/14796708.3.3.309.
- Chesser, A.S., Pritchard, S.M., Johnson, G.V. 2013. Tau Clearance Mechanisms and Their Possible Role in the Pathogenesis of Alzheimer Disease. *Frontiers in neurology* 4, 122. doi:10.3389/fneur.2013.00122.
- Cheung, K.H., Mei, L., Mak, D.O., Hayashi, I., Iwatsubo, T., Kang, D.E., Fosskett, J.K. 2010. Gain-of-function enhancement of IP3 receptor modal gating by familial Alzheimer's disease-linked presenilin mutants in human cells and mouse neurons. *Science signaling* 3(114), ra22. doi:10.1126/scisignal.2000818.

- Cheung, Z.H., Ip, N.Y. 2012. Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases. *Trends in cell biology* 22(3), 169-75. doi:10.1016/j.tcb.2011.11.003.
- Chiang, H.H., Rosvall, L., Brohede, J., Axelman, K., Bjork, B.F., Nennesmo, I., Robins, T., Graff, C. 2008. Progranulin mutation causes frontotemporal dementia in the Swedish Karolinska family. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 4(6), 414-20. doi:10.1016/j.jalz.2008.09.001.
- Chow, T.W. 2005. Treatment approaches to symptoms associated with frontotemporal degeneration. *Current psychiatry reports* 7(5), 376-80.
- D'Ambrogio, A., Buratti, E., Stuani, C., Guarnaccia, C., Romano, M., Ayala, Y.M., Baralle, F.E. 2009. Functional mapping of the interaction between TDP-43 and hnRNP A2 in vivo. *Nucleic acids research* 37(12), 4116-26. doi:10.1093/nar/gkp342.
- D'Souza, I., Poorkaj, P., Hong, M., Nochlin, D., Lee, V.M., Bird, T.D., Schellenberg, G.D. 1999. Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(10), 5598-603.
- da Cruz e Silva, O.A., Henriques, A.G., Domingues, S.C., da Cruz e Silva, E.F. 2010. Wnt signalling is a relevant pathway contributing to amyloid beta- peptide-mediated neuropathology in Alzheimer's disease. *CNS & neurological disorders drug targets* 9(6), 720-6.
- Dai, R.M., Li, C.C. 2001. Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nature cell biology* 3(8), 740-4. doi:10.1038/35087056.
- Daniel, R., He, Z., Carmichael, K.P., Halper, J., Bateman, A. 2000. Cellular localization of gene expression for progranulin. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 48(7), 999-1009.
- Davidsson, P., Sjogren, M., Andreasen, N., Lindbjer, M., Nilsson, C.L., Westman-Brinkmalm, A., Blennow, K. 2002. Studies of the pathophysiological mechanisms in frontotemporal dementia by proteome analysis of CSF proteins. *Brain research Molecular brain research* 109(1-2), 128-33.
- Davies, K.J. 2001. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* 83(3-4), 301-10.
- de las Cuevas, N., Urcelay, E., Hermida, O.G., Saiz-Diaz, R.A., Bermejo, F., Ayuso, M.S., Martin-Requero, A. 2003. Ca²⁺/calmodulin-dependent modulation of cell cycle elements pRb and p27kip1 involved in the enhanced proliferation of lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia. *Neurobiology of disease* 13(3), 254-63.
- De Muynck, L., Herdewyn, S., Beel, S., Scheveneels, W., Van Den Bosch, L., Robberecht, W., Van Damme, P. 2013. The neurotrophic properties of progranulin depend on the granulin E domain but do not require sortilin binding. *Neurobiology of aging* 34(11), 2541-7. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.04.022.
- De Sarno, P., Li, X., Jope, R.S. 2002. Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by

sodium valproate and lithium. *Neuropharmacology* 43(7), 1158-64.

DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G.Y., Karydas, A., Seeley, W.W., Josephs, K.A., Coppola, G., Geschwind, D.H., Wszolek, Z.K., Feldman, H., Knopman, D.S., Petersen, R.C., Miller, B.L., Dickson, D.W., Boylan, K.B., Graff-Radford, N.R., Rademakers, R. 2011. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72(2), 245-56. doi:10.1016/j.neuron.2011.09.011.

Deng, H.X., Chen, W., Hong, S.T., Boycott, K.M., Gorrie, G.H., Siddique, N., Yang, Y., Fecto, F., Shi, Y., Zhai, H., Jiang, H., Hirano, M., Rampersaud, E., Jansen, G.H., Donkervoort, S., Bigio, E.H., Brooks, B.R., Ajroud, K., Sufit, R.L., Haines, J.L., Mugnaini, E., Pericak-Vance, M.A., Siddique, T. 2011. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 477(7363), 211-5. doi:10.1038/nature10353.

Diaper, D.C., Adachi, Y., Lazarou, L., Greenstein, M., Simoes, F.A., Di Domenico, A., Solomon, D.A., Lowe, S., Al-subaie, R., Cheng, D., Buckley, S., Humphrey, D.M., Shaw, C.E., Hirth, F. 2013. Drosophila TDP-43 dysfunction in glia and muscle cells cause cytological and behavioural phenotypes that characterize ALS and FTL. *Human molecular genetics* 22(19), 3883-93. doi:10.1093/hmg/ddt243.

Dickey, C.A., Ash, P., Klosak, N., Lee, W.C., Petrucelli, L., Hutton, M., Eckman, C.B. 2006. Pharmacologic reductions of total tau levels; implications for the role of microtubule dynamics in regulating tau expression. *Molecular neurodegeneration* 1, 6. doi:10.1186/1750-1326-1-6.

Dickey, C.A., Kamal, A., Lundgren, K., Klosak, N., Bailey, R.M., Dunmore, J., Ash, P., Shoraka, S., Zlatkovic, J., Eckman, C.B., Patterson, C., Dickson, D.W., Nahman, N.S., Jr., Hutton, M., Burrows, F., Petrucelli, L. 2007. The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. *The Journal of clinical investigation* 117(3), 648-58. doi:10.1172/jci29715.

Dickson, D.W. 2008. TDP-43 immunoreactivity in neurodegenerative disorders: disease versus mechanism specificity. *Acta neuropathologica* 115(1), 147-9. doi:10.1007/s00401-007-0323-5.

Dickson, M.A., Tap, W.D., Keohan, M.L., D'Angelo, S.P., Gounder, M.M., Antonescu, C.R., Landa, J., Qin, L.X., Rathbone, D.D., Condly, M.M., Ustoyev, Y., Crago, A.M., Singer, S., Schwartz, G.K. 2013. Phase II trial of the CDK4 inhibitor PD0332991 in patients with advanced CDK4-amplified well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31(16), 2024-8. doi:10.1200/jco.2012.46.5476.

Donahue, C.P., Ni, J., Rozners, E., Glicksman, M.A., Wolfe, M.S. 2007. Identification of tau stem loop RNA stabilizers. *Journal of biomolecular screening* 12(6), 789-99. doi:10.1177/1087057107302676.

Dormann, D., Haass, C. 2013. Fused in sarcoma (FUS): An oncogene goes awry in neurodegeneration. *Molecular and cellular neurosciences*. doi:10.1016/j.mcn.2013.03.006.

-
- Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Pinol-Roma, S., Burd, C.G. 1993. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. Annual review of biochemistry 62, 289-321. doi:10.1146/annurev.bi.62.070193.001445.
- Du, L., Jung, M.E., Damoiseaux, R., Completo, G., Fike, F., Ku, J.M., Nahas, S., Piao, C., Hu, H., Gatti, R.A. 2013. A New Series of Small Molecular Weight Compounds Induce Read Through of All Three Types of Nonsense Mutations in the ATM Gene. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 21(9), 1653-60. doi:10.1038/mt.2013.150.
- Duncan, J.E., Goldstein, L.S. 2006. The genetics of axonal transport and axonal transport disorders. PLoS genetics 2(9), e124. doi:10.1371/journal.pgen.0020124.
- Eckert, A., Oster, M., Zerfass, R., Hennerici, M., Muller, W.E. 2001. Elevated levels of fragmented DNA nucleosomes in native and activated lymphocytes indicate an enhanced sensitivity to apoptosis in sporadic Alzheimer's disease. Specific differences to vascular dementia. Dementia and geriatric cognitive disorders 12(2), 98-105. doi:51242.
- Eckmann, J., Eckert, S.H., Leuner, K., Muller, W.E., Eckert, G.P. 2013. Mitochondria: mitochondrial membranes in brain ageing and neurodegeneration. The international journal of biochemistry & cell biology 45(1), 76-80. doi:10.1016/j.biocel.2012.06.009.
- Elvira, G., Wasiak, S., Blandford, V., Tong, X.K., Serrano, A., Fan, X., del Rayo Sanchez-Carbente, M., Servant, F., Bell, A.W., Boismenu, D., Lacaille, J.C., McPherson, P.S., DesGroseillers, L., Sossin, W.S. 2006. Characterization of an RNA granule from developing brain. Molecular & cellular proteomics : MCP 5(4), 635-51. doi:10.1074/mcp.M500255-MCP200.
- Episcopo, F.L., Tirolo, C., Testa, N., Caniglia, S., Morale, M.C., Marchetti, B. 2013. Reactive astrocytes are key players in nigrostriatal dopaminergic neurorepair in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: focus on endogenous neurorestoration. Current aging science 6(1), 45-55.
- Eriksen, J.L., Mackenzie, I.R. 2008. Progranulin: normal function and role in neurodegeneration. Journal of neurochemistry 104(2), 287-97. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04968.x.
- Esmaeli-Azad, B., McCarty, J.H., Feinstein, S.C. 1994. Sense and antisense transfection analysis of tau function: tau influences net microtubule assembly, neurite outgrowth and neuritic stability. Journal of cell science 107 (Pt 4), 869-79.
- Esteras, N., Alquezar, C., Bermejo-Pareja, F., Bialopiotrowicz, E., Wojda, U., Martin-Requero, A. 2013. Downregulation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity by calmodulin KII modulates p21Cip1 levels and survival of immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients. Neurobiology of aging 34(4), 1090-100. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.10.014.
- Etcheberrigaray, R., Ibarreta, D. 2001. [Ionic channels and second messenger alterations in Alzheimer's disease. Relevance of studies in nonneuronal cells]. Revista de neurologia 33(8), 740-9.
- Feddersen, R.M., Ehlenfeldt, R., Yunis, W.S., Clark, H.B., Orr, H.T. 1992. Disrupted cerebellar cortical development and progressive degeneration of Purkinje cells in SV40 T antigen transgenic mice. Neuron 9(5), 955-66.

- Fellgiebel, A., Muller, M.J., Hiemke, C., Bartenstein, P., Schreckenberger, M. 2007. Clinical improvement in a case of frontotemporal dementia under aripiprazole treatment corresponds to partial recovery of disturbed frontal glucose metabolism. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry* 8(2), 123-6. doi:10.1080/15622970601016538.
- Ferrer, I. 1999. Neurons and their dendrites in frontotemporal dementia. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 10 Suppl 1, 55-60. doi:51214.
- Fiesel, F.C., Voigt, A., Weber, S.S., Van den Haute, C., Waldenmaier, A., Gorner, K., Walter, M., Anderson, M.L., Kern, J.V., Rasse, T.M., Schmidt, T., Springer, W., Kirchner, R., Bonin, M., Neumann, M., Baekelandt, V., Alunni-Fabbroni, M., Schulz, J.B., Kahle, P.J. 2010. Knockdown of transactive response DNA-binding protein (TDP-43) downregulates histone deacetylase 6. *The EMBO journal* 29(1), 209-21. doi:10.1038/emboj.2009.324.
- Finkelstein, R.A., Li, Y., Liu, B., Shuja, F., Fukudome, E., Velmahos, G.C., deMoya, M., Alam, H.B. 2010. Treatment with histone deacetylase inhibitor attenuates MAP kinase mediated liver injury in a lethal model of septic shock. *The Journal of surgical research* 163(1), 146-54. doi:10.1016/j.jss.2010.04.024.
- Fischer, P.M. 2008. Turning down tau phosphorylation. *Nature chemical biology* 4(8), 448-9. doi:10.1038/nchembio0808-448.
- Forman, M.S., Mackenzie, I.R., Cairns, N.J., Swanson, E., Boyer, P.J., Drachman, D.A., Jhaveri, B.S., Karlawish, J.H., Pestronk, A., Smith, T.W., Tu, P.H., Watts, G.D., Markesbery, W.R., Smith, C.D., Kimonis, V.E. 2006. Novel ubiquitin neuropathology in frontotemporal dementia with valosin-containing protein gene mutations. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 65(6), 571-81.
- Forman, M.S., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. 2004. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nature medicine* 10(10), 1055-63. doi:10.1038/nm1113.
- Fornai, F., Meininger, V., Silani, V. 2011. Future therapeutical strategies dictated by pre-clinical evidence in ALS. *Archives italiennes de biologie* 149(1), 169-74. doi:10.4449/aib.v149i1.1269.
- Foulds, P., McAuley, E., Gibbons, L., Davidson, Y., Pickering-Brown, S.M., Neary, D., Snowden, J.S., Allsop, D., Mann, D.M. 2008. TDP-43 protein in plasma may index TDP-43 brain pathology in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. *Acta neuropathologica* 116(2), 141-6. doi:10.1007/s00401-008-0389-8.
- Fratta, P., Mizielińska, S., Nicoll, A.J., Zloh, M., Fisher, E.M., Parkinson, G., Isaacs, A.M. 2012. C9orf72 hexanucleotide repeat associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia forms RNA G-quadruplexes. *Scientific reports* 2, 1016. doi:10.1038/srep01016.
- Freedman, M. 2007. Frontotemporal dementia: recommendations for therapeutic studies, designs, and approaches. *The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques* 34 Suppl 1, S118-24.
- Fuentealba, R.A., Udan, M., Bell, S., Wegorzewska, I., Shao, J., Diamond, M.I., Weihl, C.C., Baloh, R.H. 2010. In-

- teraction with polyglutamine aggregates reveals a Q/N-rich domain in TDP-43. *The Journal of biological chemistry* 285(34), 26304-14. doi:10.1074/jbc.M110.125039.
- Fuhrmann, M., Bittner, T., Jung, C.K., Burgold, S., Page, R.M., Mitteregger, G., Haass, C., LaFerla, F.M., Kretschmar, H., Herms, J. 2010. Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature neuroscience* 13(4), 411-3. doi:10.1038/nn.2511.
- Fujii, R., Okabe, S., Urushido, T., Inoue, K., Yoshimura, A., Tachibana, T., Nishikawa, T., Hicks, G.G., Takumi, T. 2005. The RNA binding protein TLS is translocated to dendritic spines by mGluR5 activation and regulates spine morphology. *Current biology : CB* 15(6), 587-93. doi:10.1016/j.cub.2005.01.058.
- Furukawa, K., D'Souza, I., Crudder, C.H., Onodera, H., Itoyama, Y., Poorkaj, P., Bird, T.D., Schellenberg, G.D. 2000. Pro-apoptotic effects of tau mutations in chromosome 17 frontotemporal dementia and parkinsonism. *Neuroreport* 11(1), 57-60.
- Galan, L., Gomez-Pinedo, U., Vela-Souto, A., Guerrero-Sola, A., Barcia, J.A., Gutierrez, A.R., Martinez-Martinez, A., Jimenez, M.S., Garcia-Verdugo, J.M., Matias-Guiu, J. 2011. Subventricular zone in motor neuron disease with frontotemporal dementia. *Neuroscience letters* 499(1), 9-13. doi:10.1016/j.neulet.2011.05.019.
- Galimberti, D., D'Addario, C., Dell'osso, B., Fenoglio, C., Marcone, A., Cerami, C., Cappa, S.F., Palazzo, M.C., Arosio, B., Mari, D., Maccarrone, M., Bresolin, N., Altamura, A.C., Scarpini, E. 2013. Progranulin gene (GRN) promoter methylation is increased in patients with sporadic frontotemporal lobar degeneration. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 34(6), 899-903. doi:10.1007/s10072-012-1151-5.
- Gallinari, P., Di Marco, S., Jones, P., Pallaoro, M., Steinkuhler, C. 2007. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell research* 17(3), 195-211. doi:10.1038/sj.cr.7310149.
- Gao, X., Joselin, A.P., Wang, L., Kar, A., Ray, P., Bateman, A., Goate, A.M., Wu, J.Y. 2010. Progranulin promotes neurite outgrowth and neuronal differentiation by regulating GSK-3beta. *Protein & cell* 1(6), 552-62. doi:10.1007/s13238-010-0067-1.
- Gass, J., Cannon, A., Mackenzie, I.R., Boeve, B., Baker, M., Adamson, J., Crook, R., Melquist, S., Kuntz, K., Petersen, R., Josephs, K., Pickering-Brown, S.M., Graff-Radford, N., Uitti, R., Dickson, D., Wszolek, Z., Gonzalez, J., Beach, T.G., Bigio, E., Johnson, N., Weintraub, S., Mesulam, M., White, C.L., 3rd, Woodruff, B., Caselli, R., Hsiung, G.Y., Feldman, H., Knopman, D., Hutton, M., Rademakers, R. 2006. Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration. *Human molecular genetics* 15(20), 2988-3001. doi:10.1093/hmg/ddl241.
- Gass, J., Lee, W.C., Cook, C., Finch, N., Stetler, C., Jansen-West, K., Lewis, J., Link, C.D., Rademakers, R., Nykjaer, A., Petrucelli, L. 2012. Progranulin regulates neuronal outgrowth independent of sortilin. *Molecular neurodegeneration* 7, 33. doi:10.1186/1750-1326-7-33.
- Gelpi, E., van der Zee, J., Estrada, A.T., van Broeckhoven, C., Sanchez-Valle, R. 2013. TARDBP mutation p.Ile383Val associated with semantic dementia and complex proteinopathy. *Neuropathology and applied*

neurobiology. doi:10.1111/nan.12063.

Geschwind, D.H., Robidoux, J., Alarcon, M., Miller, B.L., Wilhelmsen, K.C., Cummings, J.L., Nasreddine, Z.S. 2001. Dementia and neurodevelopmental predisposition: cognitive dysfunction in presymptomatic subjects precedes dementia by decades in frontotemporal dementia. *Annals of neurology* 50(6), 741-6.

Ghazi-Noori, S., Froud, K.E., Mizielinska, S., Powell, C., Smidak, M., Fernandez de Marco, M., O'Malley, C., Farmer, M., Parkinson, N., Fisher, E.M., Asante, E.A., Brandner, S., Collinge, J., Isaacs, A.M. 2012. Progressive neuronal inclusion formation and axonal degeneration in CHMP2B mutant transgenic mice. *Brain : a journal of neurology* 135(Pt 3), 819-32. doi:10.1093/brain/aws006.

Ghidoni, R., Flocco, R., Paterlini, A., Glionna, M., Caruana, L., Tonoli, E., Binetti, G., Benussi, L. 2013a. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Protein Regulates the Penetrance of Frontotemporal Lobar Degeneration in Progranulin Mutation Carriers. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. doi:10.3233/jad-131163.

Ghidoni, R., Paterlini, A., Benussi, L. 2012. Circulating progranulin as a biomarker for neurodegenerative diseases. *American journal of neurodegenerative disease* 1(2), 180-90.

Ghidoni, R., Paterlini, A., Benussi, L. 2013b. Translational proteomics in Alzheimer's disease and related disorders. *Clinical biochemistry* 46(6), 480-6. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.10.012.

Ghoshal, N., Dearborn, J.T., Wozniak, D.F., Cairns, N.J. 2012. Core features of frontotemporal dementia recapitulated in progranulin knockout mice. *Neurobiology of disease* 45(1), 395-408. doi:10.1016/j.nbd.2011.08.029.

Giannakopoulos, P., Hof, P.R., Bouras, C. 1995. Dementia lacking distinctive histopathology: clinicopathological evaluation of 32 cases. *Acta neuropathologica* 89(4), 346-55.

Gibson, G.E., Huang, H.M. 2002. Oxidative processes in the brain and non-neuronal tissues as biomarkers of Alzheimer's disease. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 7, d1007-15.

Gijssels, I., Van Broeckhoven, C., Cruts, M. 2008. Granulin mutations associated with frontotemporal lobar degeneration and related disorders: an update. *Human mutation* 29(12), 1373-86. doi:10.1002/humu.20785.

Gistelink, M., Lambert, J.C., Callaerts, P., Deraut, B., Dourlen, P. 2012. Drosophila models of tauopathies: what have we learned? *International journal of Alzheimer's disease* 2012, 970980. doi:10.1155/2012/970980.

Gitcho, M.A., Bigio, E.H., Mishra, M., Johnson, N., Weintraub, S., Mesulam, M., Rademakers, R., Chakraverty, S., Cruchaga, C., Morris, J.C., Goate, A.M., Cairns, N.J. 2009a. TARDBP 3'-UTR variant in autopsy-confirmed frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 proteinopathy. *Acta neuropathologica* 118(5), 633-45. doi:10.1007/s00401-009-0571-7.

Gitcho, M.A., Strider, J., Carter, D., Taylor-Reinwald, L., Forman, M.S., Goate, A.M., Cairns, N.J. 2009b. VCP mutations causing frontotemporal lobar degeneration disrupt localization of TDP-43 and induce cell death. *The Journal of biological chemistry* 284(18), 12384-98. doi:10.1074/jbc.M900992200.

- Gladkevich, A., Kauffman, H.F., Korf, J. 2004. Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 28(3), 559-76. doi:10.1016/j.pnpbp.2004.01.009.
- Goedert, M., Jakes, R. 2005. Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochimica et biophysica acta* 1739(2-3), 240-50. doi:10.1016/j.bbadis.2004.08.007.
- Goedert, M., Satumtira, S., Jakes, R., Smith, M.J., Kamibayashi, C., White, C.L., 3rd, Sontag, E. 2000. Reduced binding of protein phosphatase 2A to tau protein with frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 mutations. *Journal of neurochemistry* 75(5), 2155-62.
- Goldman, J.S., Adamson, J., Karydas, A., Miller, B.L., Hutton, M. 2007. New genes, new dilemmas: FTLD genetics and its implications for families. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias* 22(6), 507-15. doi:10.1177/1533317507306662.
- Goldman, J.S., Farmer, J.M., Wood, E.M., Johnson, J.K., Boxer, A., Neuhaus, J., Lomen-Hoerth, C., Wilhelmsen, K.C., Lee, V.M., Grossman, M., Miller, B.L. 2005. Comparison of family histories in FTLD subtypes and related tauopathies. *Neurology* 65(11), 1817-9. doi:10.1212/01.wnl.0000187068.92184.63.
- Gorman, A.M. 2008. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling. *Journal of cellular and molecular medicine* 12(6A), 2263-80. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00402.x.
- Gorno-Tempini, M.L., Dronkers, N.F., Rankin, K.P., Ogar, J.M., Phengrasamy, L., Rosen, H.J., Johnson, J.K., Weiner, M.W., Miller, B.L. 2004. Cognition and anatomy in three variants of primary progressive aphasia. *Annals of neurology* 55(3), 335-46. doi:10.1002/ana.10825.
- Gozuacik, D., Kimchi, A. 2004. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23(16), 2891-906. doi:10.1038/sj.onc.1207521.
- Graff-Radford, N.R., Woodruff, B.K. 2007. Frontotemporal dementia. *Seminars in neurology* 27(1), 48-57. doi:10.1055/s-2006-956755.
- Grana, X., Reddy, E.P. 1995. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 11(2), 211-9.
- Greene, L.A., Liu, D.X., Troy, C.M., Biswas, S.C. 2007. Cell cycle molecules define a pathway required for neuron death in development and disease. *Biochimica et biophysica acta* 1772(4), 392-401. doi:10.1016/j.bbadis.2006.12.003.
- Grishchuk, Y., Ginet, V., Truttmann, A.C., Clarke, P.G., Puyal, J. 2011. Beclin 1-independent autophagy contributes to apoptosis in cortical neurons. *Autophagy* 7(10), 1115-31. doi:10.4161/auto.7.10.16608.
- Grossman, M., Libon, D.J., Forman, M.S., Massimo, L., Wood, E., Moore, P., Anderson, C., Farmer, J., Chatterjee, A., Clark, C.M., Coslett, H.B., Hurtig, H.I., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. 2007a. Distinct antemortem profiles in patients with pathologically defined frontotemporal dementia. *Archives of neurology* 64(11), 1601-9.

doi:10.1001/archneur.64.11.1601.

Grossman, M., Wood, E.M., Moore, P., Neumann, M., Kwong, L., Forman, M.S., Clark, C.M., McCluskey, L.F., Miller, B.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. 2007b. TDP-43 pathologic lesions and clinical phenotype in frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions. *Archives of neurology* 64(10), 1449-54. doi:10.1001/archneur.64.10.1449.

Guerra, R.R., Kriazhev, L., Hernandez-Blazquez, F.J., Bateman, A. 2007. Progranulin is a stress-response factor in fibroblasts subjected to hypoxia and acidosis. *Growth factors* (Chur, Switzerland) 25(4), 280-5. doi:10.1080/08977190701781222.

Guha, M. 2013. Blockbuster dreams for Pfizer's CDK inhibitor. *Nature biotechnology* 31(3), 187. doi:10.1038/nbt0313-187a.

Gustafson, L. 1987. Frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type. II. Clinical picture and differential diagnosis. *Archives of gerontology and geriatrics* 6(3), 209-23.

Guthrie, C.R., Schellenberg, G.D., Kraemer, B.C. 2009. SUT-2 potentiates tau-induced neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Human molecular genetics* 18(10), 1825-38. doi:10.1093/hmg/ddp099.

Halleskog, C., Dijksterhuis, J.P., Kilander, M.B., Becerril-Ortega, J., Villaescusa, J.C., Lindgren, E., Arenas, E., Schulte, G. 2012. Heterotrimeric G protein-dependent WNT-5A signaling to ERK1/2 mediates distinct aspects of microglia proinflammatory transformation. *Journal of neuroinflammation* 9, 111. doi:10.1186/1742-2094-9-111.

Hamano, T., Gendron, T.F., Causevic, E., Yen, S.H., Lin, W.L., Isidoro, C., Deture, M., Ko, L.W. 2008. Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression. *The European journal of neuroscience* 27(5), 1119-30. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06084.x.

Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., Mizushima, N. 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441(7095), 885-9. doi:10.1038/nature04724.

Hasegawa, M., Arai, T., Nonaka, T., Kametani, F., Yoshida, M., Hashizume, Y., Beach, T.G., Buratti, E., Baralle, F., Morita, M., Nakano, I., Oda, T., Tsuchiya, K., Akiyama, H. 2008. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 64(1), 60-70. doi:10.1002/ana.21425.

Hatakeyama, M., Weinberg, R.A. 1995. The role of RB in cell cycle control. *Progress in cell cycle research* 1, 9-19.

He, Z., Bateman, A. 2003. Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis. *Journal of molecular medicine* (Berlin, Germany) 81(10), 600-12. doi:10.1007/s00109-003-0474-3.

Helin, K. 1998. Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Current opinion in genetics & development* 8(1), 28-35.

- Hernandez-Ortega, K., Quiroz-Baez, R., Arias, C. 2011. Cell cycle reactivation in mature neurons: a link with brain plasticity, neuronal injury and neurodegenerative diseases? *Neuroscience bulletin* 27(3), 185-96. doi:10.1007/s12264-011-1002-z.
- Herrup, K., Busser, J.C. 1995. The induction of multiple cell cycle events precedes target-related neuronal death. *Development (Cambridge, England)* 121(8), 2385-95.
- Herrup, K., Neve, R., Ackerman, S.L., Copani, A. 2004. Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24(42), 9232-9. doi:10.1523/jneurosci.3347-04.2004.
- Herrup, K., Yang, Y. 2007. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nature reviews Neuroscience* 8(5), 368-78. doi:10.1038/nrn2124.
- Higashi, S., Kabuta, T., Nagai, Y., Tsuchiya, Y., Akiyama, H., Wada, K. 2013. TDP-43 associates with stalled ribosomes and contributes to cell survival during cellular stress. *Journal of neurochemistry* 126(2), 288-300. doi:10.1111/jnc.12194.
- Hille, A., Herrmann, M.K., Kertesz, T., Christiansen, H., Hermann, R.M., Pradier, O., Schmidberger, H., Hess, C.F. 2008. Sodium butyrate enemas in the treatment of acute radiation-induced proctitis in patients with prostate cancer and the impact on late proctitis. A prospective evaluation. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft [et al]* 184(12), 686-92. doi:10.1007/s00066-008-1896-1.
- Himmler, A. 1989. Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Molecular and cellular biology* 9(4), 1389-96.
- Hirata, Y., Yamamoto, H., Atta, M.S., Mahmoud, S., Oh-hashii, K., Kiuchi, K. 2011. Chloroquine inhibits glutamate-induced death of a neuronal cell line by reducing reactive oxygen species through sigma-1 receptor. *Journal of neurochemistry* 119(4), 839-47. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07464.x.
- Hockly, E., Richon, V.M., Woodman, B., Smith, D.L., Zhou, X., Rosa, E., Sathasivam, K., Ghazi-Noori, S., Mahal, A., Lowden, P.A., Steffan, J.S., Marsh, J.L., Thompson, L.M., Lewis, C.M., Marks, P.A., Bates, G.P. 2003. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(4), 2041-6. doi:10.1073/pnas.0437870100.
- Hodges, J.R., Patterson, K., Oxbury, S., Funnell, E. 1992. Semantic dementia. Progressive fluent aphasia with temporal lobe atrophy. *Brain : a journal of neurology* 115 (Pt 6), 1783-806.
- Hoell, J.I., Larsson, E., Runge, S., Nusbaum, J.D., Duggimpudi, S., Farazi, T.A., Hafner, M., Borkhardt, A., Sander, C., Tuschl, T. 2011. RNA targets of wild-type and mutant FET family proteins. *Nature structural & molecular biology* 18(12), 1428-31. doi:10.1038/nsmb.2163.
- Hogg, M., Grujic, Z.M., Baker, M., Demirci, S., Guillozet, A.L., Sweet, A.P., Herzog, L.L., Weintraub, S., Mesulam, M.M., LaPointe, N.E., Gamblin, T.C., Berry, R.W., Binder, L.I., de Silva, R., Lees, A., Espinoza, M., Davies, P., Grover, A., Sahara, N., Ishizawa, T., Dickson, D., Yen, S.H., Hutton, M., Bigio, E.H. 2003. The L266V tau mu-

- tation is associated with frontotemporal dementia and Pick-like 3R and 4R tauopathy. *Acta neuropathologica* 106(4), 323-36. doi:10.1007/s00401-003-0734-x.
- Hoglinger, G.U., Breunig, J.J., Depboylu, C., Rouaux, C., Michel, P.P., Alvarez-Fischer, D., Boutillier, A.L., Degregori, J., Oertel, W.H., Rakic, P., Hirsch, E.C., Hunot, S. 2007. The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(9), 3585-90. doi:10.1073/pnas.0611671104.
- Holm, I.E., Englund, E., Mackenzie, I.R., Johannsen, P., Isaacs, A.M. 2007. A reassessment of the neuropathology of frontotemporal dementia linked to chromosome 3. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 66(10), 884-91. doi:10.1097/nen.0b013e3181567f02.
- Holm, I.E., Isaacs, A.M., Mackenzie, I.R. 2009. Absence of FUS-immunoreactive pathology in frontotemporal dementia linked to chromosome 3 (FTD-3) caused by mutation in the CHMP2B gene. *Acta neuropathologica* 118(5), 719-20. doi:10.1007/s00401-009-0593-1.
- Houlden, H., Baker, M., Morris, H.R., MacDonald, N., Pickering-Brown, S., Adamson, J., Lees, A.J., Rossor, M.N., Quinn, N.P., Kertesz, A., Khan, M.N., Hardy, J., Lantos, P.L., St George-Hyslop, P., Munoz, D.G., Mann, D., Lang, A.E., Bergeron, C., Bigio, E.H., Litvan, I., Bhatia, K.P., Dickson, D., Wood, N.W., Hutton, M. 2001. Corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy share a common tau haplotype. *Neurology* 56(12), 1702-6.
- Hovestadt, M., Kuckelkorn, U., Niewianda, A., Keller, C., Goede, A., Ay, B., Gunther, S., Janek, K., Volkmer, R., Holzhutter, H.G. 2013. Rapid degradation of solid-phase bound peptides by the 20S proteasome. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 19(9), 588-97. doi:10.1002/psc.2536.
- Hu, F., Padukkavidana, T., Vaegter, C.B., Brady, O.A., Zheng, Y., Mackenzie, I.R., Feldman, H.H., Nykjaer, A., Strittmatter, S.M. 2010. Sortilin-mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin. *Neuron* 68(4), 654-67. doi:10.1016/j.neuron.2010.09.034.
- Hu, W.T., Chen-Plotkin, A., Grossman, M., Arnold, S.E., Clark, C.M., Shaw, L.M., McCluskey, L., Elman, L., Hurtig, H.I., Siderowf, A., Lee, V.M., Soares, H., Trojanowski, J.Q. 2010. Novel CSF biomarkers for frontotemporal lobar degenerations. *Neurology* 75(23), 2079-86. doi:10.1212/WNL.0b013e318200d78d.
- Hu, W.T., Seelaar, H., Josephs, K.A., Knopman, D.S., Boeve, B.F., Sorenson, E.J., McCluskey, L., Elman, L., Schelhaas, H.J., Parisi, J.E., Kuesters, B., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Petersen, R.C., van Swieten, J.C., Grossman, M. 2009. Survival profiles of patients with frontotemporal dementia and motor neuron disease. *Archives of neurology* 66(11), 1359-64. doi:10.1001/archneurol.2009.253.
- Huang, Y., Liu, G., Zhang, B., Xu, G., Xiong, W., Yang, H. 2010. Wnt-5a regulates proliferation in lung cancer cells. *Oncology reports* 23(1), 177-81.
- Huey, E.D., Putnam, K.T., Grafman, J. 2006. A systematic review of neurotransmitter deficits and treatments in frontotemporal dementia. *Neurology* 66(1), 17-22. doi:10.1212/01.wnl.0000191304.55196.4d.

- Husseman, J.W., Nochlin, D., Vincent, I. 2000. Mitotic activation: a convergent mechanism for a cohort of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of aging* 21(6), 815-28.
- Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R.C., Stevens, M., de Graaff, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J.M., Nowotny, P., Che, L.K., Norton, J., Morris, J.C., Reed, L.A., Trojanowski, J., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahn, S., Dark, F., Tanenbergh, T., Dodd, P.R., Hayward, N., Kwok, J.B., Schofield, P.R., Andreadis, A., Snowden, J., Craufurd, D., Neary, D., Owen, F., Oostra, B.A., Hardy, J., Goate, A., van Swieten, J., Mann, D., Lynch, T., Heutink, P. 1998. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393(6686), 702-5. doi:10.1038/31508.
- Ibarreta, D., Parrilla, R., Ayuso, M.S. 1997. Altered Ca²⁺ homeostasis in lymphoblasts from patients with late-onset Alzheimer disease. *Alzheimer disease and associated disorders* 11(4), 220-7.
- Igaz, L.M., Kwong, L.K., Chen-Plotkin, A., Winton, M.J., Unger, T.L., Xu, Y., Neumann, M., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. 2009. Expression of TDP-43 C-terminal Fragments in Vitro Recapitulates Pathological Features of TDP-43 Proteinopathies. *The Journal of biological chemistry* 284(13), 8516-24. doi:10.1074/jbc.M809462200.
- Igaz, L.M., Kwong, L.K., Lee, E.B., Chen-Plotkin, A., Swanson, E., Unger, T., Malunda, J., Xu, Y., Winton, M.J., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. 2011. Dysregulation of the ALS-associated gene TDP-43 leads to neuronal death and degeneration in mice. *The Journal of clinical investigation* 121(2), 726-38. doi:10.1172/jci44867.
- Ikeda, M., Brown, J., Holland, A.J., Fukuhara, R., Hodges, J.R. 2002. Changes in appetite, food preference, and eating habits in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 73(4), 371-6.
- Ikeda, M., Ishikawa, T., Tanabe, H. 2004a. Epidemiology of frontotemporal lobar degeneration. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 17(4), 265-8. doi:10.1159/000077151.
- Ikeda, M., Shigenobu, K., Fukuhara, R., Hokoishi, K., Maki, N., Nebu, A., Komori, K., Tanabe, H. 2004b. Efficacy of fluvoxamine as a treatment for behavioral symptoms in frontotemporal lobar degeneration patients. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 17(3), 117-21. doi:10.1159/000076343.
- Irwin, D.J., McMillan, C.T., Toledo, J.B., Arnold, S.E., Shaw, L.M., Wang, L.S., Van Deerlin, V., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Grossman, M. 2012. Comparison of cerebrospinal fluid levels of tau and Abeta 1-42 in Alzheimer disease and frontotemporal degeneration using 2 analytical platforms. *Archives of neurology* 69(8), 1018-25. doi:10.1001/archneurol.2012.26.
- Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wolfing, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., Napier, I.A., Eckert, A., Staufenbiel, M., Hardeman, E., Gotz, J. 2010. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142(3), 387-97. doi:10.1016/j.cell.2010.06.036.
- Jamison, J.T., Kayali, F., Rudolph, J., Marshall, M., Kimball, S.R., DeGracia, D.J. 2008. Persistent redistribution of poly-adenylated mRNAs correlates with translation arrest and cell death following global brain ischemia and reperfusion. *Neuroscience* 154(2), 504-20. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.03.057.

- Jellinger, K.A. 2006. Challenges in neuronal apoptosis. *Current Alzheimer research* 3(4), 377-91.
- Jeong, M.R., Hashimoto, R., Senatorov, V.V., Fujimaki, K., Ren, M., Lee, M.S., Chuang, D.M. 2003. Valproic acid, a mood stabilizer and anticonvulsant, protects rat cerebral cortical neurons from spontaneous cell death: a role of histone deacetylase inhibition. *FEBS letters* 542(1-3), 74-8.
- Jesso, S., Morlog, D., Ross, S., Pell, M.D., Pasternak, S.H., Mitchell, D.G., Kertesz, A., Finger, E.C. 2011. The effects of oxytocin on social cognition and behaviour in frontotemporal dementia. *Brain : a journal of neurology* 134(Pt 9), 2493-501. doi:10.1093/brain/awr171.
- Jeste, D.V., Blazer, D., Casey, D., Meeks, T., Salzman, C., Schneider, L., Tariot, P., Yaffe, K. 2008. ACNP White Paper: update on use of antipsychotic drugs in elderly persons with dementia. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33(5), 957-70. doi:10.1038/sj.npp.1301492.
- Jia, H., Pallos, J., Jacques, V., Lau, A., Tang, B., Cooper, A., Syed, A., Purcell, J., Chen, Y., Sharma, S., Sangrey, G.R., Darnell, S.B., Plasterer, H., Sadri-Vakili, G., Gottesfeld, J.M., Thompson, L.M., Rusche, J.R., Marsh, J.L., Thomas, E.A. 2012. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors targeting HDAC3 and HDAC1 ameliorate polyglutamine-elicited phenotypes in model systems of Huntington's disease. *Neurobiology of disease* 46(2), 351-61.
- Jiang, J., Fridley, B.L., Feng, Q., Abo, R.P., Brisbin, A., Batzler, A., Jenkins, G., Long, P.A., Wang, L. 2013. Genome-wide association study for biomarker identification of Rapamycin and Everolimus using a lymphoblastoid cell line system. *Frontiers in genetics* 4, 166. doi:10.3389/fgene.2013.00166.
- Jiao, J., Herl, L.D., Farese, R.V., Gao, F.B. 2010. MicroRNA-29b regulates the expression level of human progranulin, a secreted glycoprotein implicated in frontotemporal dementia. *PloS one* 5(5), e10551. doi:10.1371/journal.pone.0010551.
- Johnson, B.S., McCaffery, J.M., Lindquist, S., Gitler, A.D. 2008. A yeast TDP-43 proteinopathy model: Exploring the molecular determinants of TDP-43 aggregation and cellular toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(17), 6439-44. doi:10.1073/pnas.0802082105.
- Johnson, G.V., Stoothoff, W.H. 2004. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal of cell science* 117(Pt 24), 5721-9. doi:10.1242/jcs.01558.
- Johnson, J.K., Diehl, J., Mendez, M.F., Neuhaus, J., Shapira, J.S., Forman, M., Chute, D.J., Roberson, E.D., Pace-Savitsky, C., Neumann, M., Chow, T.W., Rosen, H.J., Forstl, H., Kurz, A., Miller, B.L. 2005. Frontotemporal lobar degeneration: demographic characteristics of 353 patients. *Archives of neurology* 62(6), 925-30. doi:10.1001/archneur.62.6.925.
- Josephs, K.A., Ahmed, Z., Katsuse, O., Parisi, J.F., Boeve, B.F., Knopman, D.S., Petersen, R.C., Davies, P., Duara, R., Graff-Radford, N.R., Uitti, R.J., Rademakers, R., Adamson, J., Baker, M., Hutton, M.L., Dickson, D.W. 2007. Neuropathologic features of frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions with pro-

- granulin gene (PGRN) mutations. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 66(2), 142-51. doi:10.1097/nen.0b013e31803020cf.
- Josephs, K.A., Duffy, J.R., Strand, E.A., Machulda, M.M., Senjem, M.L., Master, A.V., Lowe, V.J., Jack, C.R., Jr., Whitwell, J.L. 2012. Characterizing a neurodegenerative syndrome: primary progressive apraxia of speech. *Brain : a journal of neurology* 135(Pt 5), 1522-36. doi:10.1093/brain/aws032.
- Jouroukhin, Y., Ostritsky, R., Assaf, Y., Pelled, G., Giladi, E., Gozes, I. 2013. NAP (davunetide) modifies disease progression in a mouse model of severe neurodegeneration: protection against impairments in axonal transport. *Neurobiology of disease* 56, 79-94. doi:10.1016/j.nbd.2013.04.012.
- Ju, J.S., Fuentealba, R.A., Miller, S.E., Jackson, E., Piwnica-Worms, D., Baloh, R.H., Weihl, C.C. 2009. Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. *The Journal of cell biology* 187(6), 875-88. doi:10.1083/jcb.200908115.
- Ju, J.S., Weihl, C.C. 2010. Inclusion body myopathy, Paget's disease of the bone and fronto-temporal dementia: a disorder of autophagy. *Human molecular genetics* 19(R1), R38-45. doi:10.1093/hmg/ddq157.
- Ju, S., Tardiff, D.F., Han, H., Divya, K., Zhong, Q., Maquat, L.E., Bosco, D.A., Hayward, L.J., Brown, R.H., Jr., Lindquist, S., Ringe, D., Petsko, G.A. 2011. A yeast model of FUS/TLS-dependent cytotoxicity. *PLoS biology* 9(4), e1001052. doi:10.1371/journal.pbio.1001052.
- Jung, T., Grune, T. 2012. Structure of the proteasome. *Progress in molecular biology and translational science* 109, 1-39. doi:10.1016/b978-0-12-397863-9.00001-8.
- Jung, T., Grune, T. 2013. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part I-structure of proteasomes. *Redox biology* 1(1), 178-82. doi:10.1016/j.redox.2013.01.004.
- Jung, Y.S., Lee, H.Y., Kim, S.D., Park, J.S., Kim, J.K., Suh, P.G., Bae, Y.S. 2013. Wnt5a stimulates chemotactic migration and chemokine production in human neutrophils. *Experimental & molecular medicine* 45, e27. doi:10.1038/emm.2013.48.
- Kaivorinne, A.L., Moilanen, V., Kervinen, M., Renton, A.E., Traynor, B.J., Majamaa, K., Remes, A.M. 2012. Novel TARDBP Sequence Variant and C9ORF72 Repeat Expansion in a Family With Frontotemporal Dementia. *Alzheimer disease and associated disorders*. doi:10.1097/WAD.0b013e318266fae5.
- Kanda, T., Ishii, K., Uemura, T., Miyamoto, N., Yoshikawa, T., Kono, A.K., Mori, E. 2008. Comparison of grey matter and metabolic reductions in frontotemporal dementia using FDG-PET and voxel-based morphometric MR studies. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 35(12), 2227-34. doi:10.1007/s00259-008-0871-5.
- Kao, A.W., Eisenhut, R.J., Martens, L.H., Nakamura, A., Huang, A., Bagley, J.A., Zhou, P., de Luis, A., Neukomm, L.J., Cabello, J., Farese, R.V., Jr., Kenyon, C. 2011. A neurodegenerative disease mutation that accelerates the clearance of apoptotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

- America 108(11), 4441-6. doi:10.1073/pnas.1100650108.
- Katsel, P., Tan, W., Fam, P., Purohit, D.P., Haroutunian, V. 2013. Cycle checkpoint abnormalities during dementia: a plausible association with the loss of protection against oxidative stress in Alzheimer's disease. *PloS one* 8(7), e68361. doi:10.1371/journal.pone.0068361.
- Kawahara, Y., Mieda-Sato, A. 2012. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(9), 3347-52. doi:10.1073/pnas.1112427109.
- Kayasuga, Y., Chiba, S., Suzuki, M., Kikusui, T., Matsuwaki, T., Yamanouchi, K., Kotaki, H., Horai, R., Iwakura, Y., Nishihara, M. 2007. Alteration of behavioural phenotype in mice by targeted disruption of the progranulin gene. *Behavioural brain research* 185(2), 110-8. doi:10.1016/j.bbr.2007.07.020.
- Kaye, E.D., Petrovic-Poljak, A., Verhoeff, N.P., Freedman, M. 2010. Frontotemporal dementia and pharmacologic interventions. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 22(1), 19-29. doi:10.1176/appi.neuropsych.22.1.19.
- Kazantsev, A.G., Thompson, L.M. 2008. Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nature reviews Drug discovery* 7(10), 854-68. doi:10.1038/nrd2681.
- Kermer, P., Liman, J., Weishaupt, J.H., Bahr, M. 2004. Neuronal apoptosis in neurodegenerative diseases: from basic research to clinical application. *Neuro-degenerative diseases* 1(1), 9-19. doi:10.1159/000076665.
- Kerr, J.F.R. 2002. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181-182, 471-4.
- Kertesz, A., McMonagle, P., Blair, M., Davidson, W., Munoz, D.G. 2005. The evolution and pathology of frontotemporal dementia. *Brain : a journal of neurology* 128(Pt 9), 1996-2005. doi:10.1093/brain/awh598.
- Kertesz, A., Morlog, D., Light, M., Blair, M., Davidson, W., Jesso, S., Brashear, R. 2008. Galantamine in frontotemporal dementia and primary progressive aphasia. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 25(2), 178-85. doi:10.1159/000113034.
- Kilander, M.B., Dijksterhuis, J.P., Ganji, R.S., Bryja, V., Schulte, G. 2011. WNT-5A stimulates the GDP/GTP exchange at pertussis toxin-sensitive heterotrimeric G proteins. *Cellular signalling* 23(3), 550-4. doi:10.1016/j.cellsig.2010.11.004.
- Kim, H.J., Kim, N.C., Wang, Y.D., Scarborough, E.A., Moore, J., Diaz, Z., MacLea, K.S., Freibaum, B., Li, S., Molliex, A., Kanagaraj, A.P., Carter, R., Boylan, K.B., Wojtas, A.M., Rademakers, R., Pinkus, J.L., Greenberg, S.A., Trojanowski, J.Q., Traynor, B.J., Smith, B.N., Topp, S., Gkazi, A.S., Miller, J., Shaw, C.E., Kottlors, M., Kirschner, J., Pestronk, A., Li, Y.R., Ford, A.F., Gitler, A.D., Benatar, M., King, O.D., Kimonis, V.E., Ross, E.D., Weihl, C.C., Shorter, J., Taylor, J.P. 2013. Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature* 495(7442), 467-73. doi:10.1038/nature11922.
- Kim, H.J., Rowe, M., Ren, M., Hong, J.S., Chen, P.S., Chuang, D.M. 2007. Histone deacetylase inhibitors exhibit

-
- anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 321(3), 892-901. doi:10.1124/jpet.107.120188.
- Kim, N.C., Tresse, E., Kolaitis, R.M., Molliex, A., Thomas, R.E., Alami, N.H., Wang, B., Joshi, A., Smith, R.B., Ritson, G.P., Winborn, B.J., Moore, J., Lee, J.Y., Yao, T.P., Pallanck, L., Kundu, M., Taylor, J.P. 2013. VCP is essential for mitochondrial quality control by PINK1/Parkin and this function is impaired by VCP mutations. *Neuron* 78(1), 65-80. doi:10.1016/j.neuron.2013.02.029.
- Kim, S.H., Shi, Y., Hanson, K.A., Williams, L.M., Sakasai, R., Bowler, M.J., Tibbetts, R.S. 2009. Potentiation of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-associated TDP-43 aggregation by the proteasome-targeting factor, ubiquitin 1. *The Journal of biological chemistry* 284(12), 8083-92. doi:10.1074/jbc.M808064200.
- King, O.D., Gitler, A.D., Shorter, J. 2012. The tip of the iceberg: RNA-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease. *Brain research* 1462, 61-80. doi:10.1016/j.brainres.2012.01.016.
- Kitagaki, H., Mori, E., Hirono, N., Ikejiri, Y., Ishii, K., Imamura, T., Ikeda, M., Yamaji, S., Yamashita, H., Shimomura, T., Nakagawa, Y. 1997. Alteration of white matter MR signal intensity in frontotemporal dementia. *AJNR American journal of neuroradiology* 18(2), 367-78.
- Klein, J.A., Ackerman, S.L. 2003. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation* 111(6), 785-93. doi:10.1172/jci18182.
- Klein, J.A., Longo-Guess, C.M., Rossmann, M.P., Seburn, K.L., Hurd, R.E., Frankel, W.N., Bronson, R.T., Ackerman, S.L. 2002. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419(6905), 367-74. doi:10.1038/nature01034.
- Kleinberger, G., Wils, H., Ponsaerts, P., Joris, G., Timmermans, J.P., Van Broeckhoven, C., Kumar-Singh, S. 2010. Increased caspase activation and decreased TDP-43 solubility in progranulin knockout cortical cultures. *Journal of neurochemistry* 115(3), 735-47. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06961.x.
- Kocerha, J., Kouri, N., Baker, M., Finch, N., DeJesus-Hernandez, M., Gonzalez, J., Chidamparam, K., Josephs, K.A., Boeve, B.F., Graff-Radford, N.R., Crook, J., Dickson, D.W., Rademakers, R. 2011. Altered microRNA expression in frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 pathology caused by progranulin mutations. *BMC genomics* 12, 527. doi:10.1186/1471-2164-12-527.
- Koistinen, P. 1987. Human peripheral blood and bone marrow cell separation using density gradient centrifugation on Lymphoprep and Percoll in haematological diseases. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 47(7), 709-14.
- Kokoulina, P., Rohn, T.T. 2010. Caspase-cleaved transactivation response DNA-binding protein 43 in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neuro-degenerative diseases* 7(4), 243-50. doi:10.1159/000287952.

- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K. 2006. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441(7095), 880-4. doi:10.1038/nature04723.
- Komatsu, M., Wang, Q.J., Holstein, G.R., Friedrich, V.L., Jr., Iwata, J., Kominami, E., Chait, B.T., Tanaka, K., Yue, Z. 2007. Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(36), 14489-94. doi:10.1073/pnas.0701311104.
- Kono, M., Dunn, I.S., Durda, P.J., Butera, D., Rose, L.B., Haggerty, T.J., Benson, E.M., Kurnick, J.T. 2006. Role of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the regulation of human melanocytic antigen expression. *Molecular cancer research : MCR* 4(10), 779-92. doi:10.1158/1541-7786.mcr-06-0077.
- Korade, Z., Mirnics, K. 2011. Wnt signaling as a potential therapeutic target for frontotemporal dementia. *Neuron* 71(6), 955-7. doi:10.1016/j.neuron.2011.09.002.
- Kovacs, G.G., Murrell, J.R., Horvath, S., Haraszti, L., Majtenyi, K., Molnar, M.J., Budka, H., Ghetti, B., Spina, S. 2009. TARDBP variation associated with frontotemporal dementia, supranuclear gaze palsy, and chorea. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 24(12), 1843-7. doi:10.1002/mds.22697.
- Kraemer, B.C., Schuck, T., Wheeler, J.M., Robinson, L.C., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., Schellenberg, G.D. 2010. Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis. *Acta neuropathologica* 119(4), 409-19. doi:10.1007/s00401-010-0659-0.
- Kruman, II, Wersto, R.P., Cardozo-Pelaez, F., Smilenov, L., Chan, S.L., Chrest, F.J., Emokpae, R., Jr., Gorospe, M., Mattson, M.P. 2004. Cell cycle activation linked to neuronal cell death initiated by DNA damage. *Neuron* 41(4), 549-61.
- Kryndushkin, D., Wickner, R.B., Shewmaker, F. 2011. FUS/TLS forms cytoplasmic aggregates, inhibits cell growth and interacts with TDP-43 in a yeast model of amyotrophic lateral sclerosis. *Protein & cell* 2(3), 223-36. doi:10.1007/s13238-011-1525-0.
- Kwiatkowski, T.J., Jr., Bosco, D.A., Leclerc, A.L., Tamrazian, E., Vanderburg, C.R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T., Valdmanis, P., Rouleau, G.A., Hosler, B.A., Cortelli, P., de Jong, P.J., Yoshinaga, Y., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Yan, J., Ticozzi, N., Siddique, T., McKenna-Yasek, D., Sapp, P.C., Horvitz, H.R., Landers, J.E., Brown, R.H., Jr. 2009. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, NY)* 323(5918), 1205-8. doi:10.1126/science.1166066.
- Kwok, J.B., Teber, E.T., Loy, C., Hallupp, M., Nicholson, G., Mellick, G.D., Buchanan, D.D., Silburn, P.A., Schofield, P.R. 2004. Tau haplotypes regulate transcription and are associated with Parkinson's disease. *Annals of neurology* 55(3), 329-34. doi:10.1002/ana.10826.
- Kwong, L.K., Neumann, M., Sampathu, D.M., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. 2007. TDP-43 proteinopathy: the neuropathology underlying major forms of sporadic and familial frontotemporal lobar degeneration and motor neuron disease. *Acta neuropathologica* 114(1), 63-70. doi:10.1007/s00401-007-0226-5.

- L'Episcopo, F., Tirollo, C., Testa, N., Caniglia, S., Morale, M.C., Deleidi, M., Serapide, M.F., Pluchino, S., Marchetti, B. 2012. Plasticity of subventricular zone neuroprogenitors in MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) mouse model of Parkinson's disease involves cross talk between inflammatory and Wnt/beta-catenin signaling pathways: functional consequences for neuroprotection and repair. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32(6), 2062-85. doi:10.1523/jneurosci.5259-11.2012.
- Lagier-Tourenne, C., Cleveland, D.W. 2009. Rethinking ALS: the FUS about TDP-43. *Cell* 136(6), 1001-4. doi:10.1016/j.cell.2009.03.006.
- Lamy, L., Ngo, V.N., Emre, N.C., Shaffer, A.L., 3rd, Yang, Y., Tian, E., Nair, V., Kruhlak, M.J., Zingone, A., Landgren, O., Staudt, L.M. 2013. Control of autophagic cell death by caspase-10 in multiple myeloma. *Cancer cell* 23(4), 435-49. doi:10.1016/j.ccr.2013.02.017.
- Langley, B., Gensert, J.M., Beal, M.F., Ratan, R.R. 2005. Remodeling chromatin and stress resistance in the central nervous system: histone deacetylase inhibitors as novel and broadly effective neuroprotective agents. *Current drug targets CNS and neurological disorders* 4(1), 41-50.
- Lanson, N.A., Jr., Maltare, A., King, H., Smith, R., Kim, J.H., Taylor, J.P., Lloyd, T.E., Pandey, U.B. 2011. A Drosophila model of FUS-related neurodegeneration reveals genetic interaction between FUS and TDP-43. *Human molecular genetics* 20(13), 2510-23. doi:10.1093/hmg/ddr150.
- Le Ber, I., Camuzat, A., Guerreiro, R., Bouya-Ahmed, K., Bras, J., Nicolas, G., Gabelle, A., Didic, M., De Septenville, A., Millecamps, S., Lenglet, T., Latouche, M., Kabashi, E., Campion, D., Hannequin, D., Hardy, J., Brice, A. 2013. SQSTM1 Mutations in French Patients With Frontotemporal Dementia or Frontotemporal Dementia With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA neurology*. doi:10.1001/jamaneurol.2013.3849.
- Le Ber, I., Camuzat, A., Hannequin, D., Pasquier, F., Guedj, E., Rovelet-Lecrux, A., Hahn-Barma, V., van der Zee, J., Clot, F., Bakchine, S., Puel, M., Ghanim, M., Lacomblez, L., Mikol, J., Deramecourt, V., Lejeune, P., de la Sayette, V., Belliard, S., Vercelletto, M., Meyrignac, C., Van Broeckhoven, C., Lambert, J.C., Verpillat, P., Campion, D., Habert, M.O., Dubois, B., Brice, A. 2008. Phenotype variability in progranulin mutation carriers: a clinical, neuropsychological, imaging and genetic study. *Brain : a journal of neurology* 131(Pt 3), 732-46. doi:10.1093/brain/awn012.
- Le Ber, I., van der Zee, J., Hannequin, D., Gijssels, I., Campion, D., Puel, M., Laquerriere, A., De Pooter, T., Camuzat, A., Van den Broeck, M., Dubois, B., Sellal, F., Lacomblez, L., Vercelletto, M., Thomas-Anterion, C., Michel, B.F., Golfier, V., Didic, M., Salachas, F., Duyckaerts, C., Cruts, M., Verpillat, P., Van Broeckhoven, C., Brice, A. 2007. Progranulin null mutations in both sporadic and familial frontotemporal dementia. *Human mutation* 28(9), 846-55. doi:10.1002/humu.20520.
- Lee, G., Neve, R.L., Kosik, K.S. 1989. The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* 2(6), 1615-24.
- Lee, H.G., Chen, Q., Wolfram, J.A., Richardson, S.L., Liner, A., Siedlak, S.L., Zhu, X., Ziats, N.P., Fujioka, H., Felsher, D.W., Castellani, R.J., Valencik, M.L., McDonald, J.A., Hoit, B.D., Lesnfsky, E.J., Smith, M.A. 2009. Cell cycle re-entry and mitochondrial defects in myc-mediated hypertrophic cardiomyopathy and heart failure. *PLoS one* 4(9), e7172. doi:10.1371/journal.pone.0007172.

- Lee, J.H., Yu, W.H., Kumar, A., Lee, S., Mohan, P.S., Peterhoff, C.M., Wolfe, D.M., Martinez-Vicente, M., Massey, A.C., Sovak, G., Uchiyama, Y., Westaway, D., Cuervo, A.M., Nixon, R.A. 2010. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* 141(7), 1146-58. doi:10.1016/j.cell.2010.05.008.
- Lee, J.Y., Koga, H., Kawaguchi, Y., Tang, W., Wong, E., Gao, Y.S., Pandey, U.B., Kaushik, S., Tresse, E., Lu, J., Taylor, J.P., Cuervo, A.M., Yao, T.P. 2010. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *The EMBO journal* 29(5), 969-80. doi:10.1038/emboj.2009.405.
- Lee, K., Suzuki, H., Aiso, S., Matsuoka, M. 2012. Overexpression of TDP-43 causes partially p53-dependent G2/M arrest and p53-independent cell death in HeLa cells. *Neuroscience letters* 506(2), 271-6. doi:10.1016/j.neulet.2011.11.021.
- Leugers, C.J., Koh, J.Y., Hong, W., Lee, G. 2013. Tau in MAPK activation. *Frontiers in neurology* 4, 161. doi:10.3389/fneur.2013.00161.
- Li, B., Zhong, L., Yang, X., Andersson, T., Huang, M., Tang, S.J. 2011. WNT5A signaling contributes to Abeta-induced neuroinflammation and neurotoxicity. *PloS one* 6(8), e22920. doi:10.1371/journal.pone.0022920.
- Li, F.Q., Wang, T., Pei, Z., Liu, B., Hong, J.S. 2005. Inhibition of microglial activation by the herbal flavonoid baicalein attenuates inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons. *Journal of neural transmission* (Vienna, Austria : 1996) 112(3), 331-47. doi:10.1007/s00702-004-0213-0.
- Li, J., Le, W. 2013. Modeling neurodegenerative diseases in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental neurology*. doi:10.1016/j.expneurol.2013.09.024.
- Li, L., Cheung, T., Chen, J., Herrup, K. 2011. A comparative study of five mouse models of Alzheimer's disease: cell cycle events reveal new insights into neurons at risk for death. *International journal of Alzheimer's disease* 2011, 171464. doi:10.4061/2011/171464.
- Liachko, N.F., Guthrie, C.R., Kraemer, B.C. 2010. Phosphorylation promotes neurotoxicity in a *Caenorhabditis elegans* model of TDP-43 proteinopathy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(48), 16208-19. doi:10.1523/jneurosci.2911-10.2010.
- Liachko, N.F., McMillan, P.J., Guthrie, C.R., Bird, T.D., Leverenz, J.B., Kraemer, B.C. 2013. CDC7 inhibition blocks pathological TDP-43 phosphorylation and neurodegeneration. *Annals of neurology* 74(1), 39-52. doi:10.1002/ana.23870.
- Liang, C.C., Wang, C., Peng, X., Gan, B., Guan, J.L. 2010. Neural-specific deletion of FIP200 leads to cerebellar degeneration caused by increased neuronal death and axon degeneration. *The Journal of biological chemistry* 285(5), 3499-509. doi:10.1074/jbc.M109.072389.
- Liang, H., Chen, Q., Coles, A.H., Anderson, S.J., Pihan, G., Bradley, A., Gerstein, R., Jurecic, R., Jones, S.N. 2003. Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer cell* 4(5), 349-60.

- Lindquist, S.L., Kelly, J.W. 2011. Chemical and biological approaches for adapting proteostasis to ameliorate protein misfolding and aggregation diseases: progress and prognosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3(12). doi:10.1101/cshperspect.a004507.
- Lipinski, M.M., Zheng, B., Lu, T., Yan, Z., Py, B.F., Ng, A., Xavier, R.J., Li, C., Yankner, B.A., Scherzer, C.R., Yuan, J. 2010. Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(32), 14164-9. doi:10.1073/pnas.1009485107.
- Litvan, I., Bhatia, K.P., Burn, D.J., Goetz, C.G., Lang, A.E., McKeith, I., Quinn, N., Sethi, K.D., Shults, C., Wenning, G.K. 2003. Movement Disorders Society Scientific Issues Committee report: SIC Task Force appraisal of clinical diagnostic criteria for Parkinsonian disorders. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 18(5), 467-86. doi:10.1002/mds.10459.
- Liu-Yesucevitz, L., Bassell, G.J., Gitler, A.D., Hart, A.C., Klann, E., Richter, J.D., Warren, S.T., Wolozin, B. 2011. Local RNA translation at the synapse and in disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31(45), 16086-93. doi:10.1523/jneurosci.4105-11.2011.
- Liu-Yesucevitz, L., Bilgutay, A., Zhang, Y.J., Vanderweyde, T., Citro, A., Mehta, T., Zaarur, N., McKee, A., Bowser, R., Sherman, M., Petrucelli, L., Wolozin, B. 2010. Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue. *PloS one* 5(10), e13250. doi:10.1371/journal.pone.0013250.
- Liu, D.X., Greene, L.A. 2001. Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint. *Cell and tissue research* 305(2), 217-28.
- Liu, W., Miller, B.L., Kramer, J.H., Rankin, K., Wyss-Coray, C., Gearhart, R., Phengrasamy, L., Weiner, M., Rosen, H.J. 2004. Behavioral disorders in the frontal and temporal variants of frontotemporal dementia. *Neurology* 62(5), 742-8.
- Liu, X., Li, D., Zhang, W., Guo, M., Zhan, Q. 2012. Long non-coding RNA gadd7 interacts with TDP-43 and regulates Cdk6 mRNA decay. *The EMBO journal* 31(23), 4415-27. doi:10.1038/emboj.2012.292.
- Liu, Y., Peacey, E., Dickson, J., Donahue, C.P., Zheng, S., Varani, G., Wolfe, M.S. 2009. Mitoxantrone analogues as ligands for a stem-loop structure of tau pre-mRNA. *Journal of medicinal chemistry* 52(21), 6523-6. doi:10.1021/jm9013407.
- Lockshin, R.A., Zakeri, Z. 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36(12), 2405-19.
- Lomen-Hoerth, C., Anderson, T., Miller, B. 2002. The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology* 59(7), 1077-9.
- Lopez-Atalaya, J.P., Gervasini, C., Mottadelli, F., Spena, S., Piccione, M., Scarano, G., Selicorni, A., Barco, A., Larizza, L. 2012. Histone acetylation deficits in lymphoblastoid cell lines from patients with Rubinstein-Taybi syndrome. *Journal of medical genetics* 49(1), 66-74. doi:10.1136/jmedgenet-2011-100354.

- Lopez de Munain, A., Alzualde, A., Gorostidi, A., Otaegui, D., Ruiz-Martinez, J., Indakoetxea, B., Ferrer, I., Perez-Tur, J., Saenz, A., Bergareche, A., Barandiaran, M., Poza, J.J., Zabalza, R., Ruiz, I., Urtasun, M., Fernandez-Manchola, I., Olasagasti, B., Espinal, J.B., Olaskoaga, J., Ruibal, M., Moreno, F., Carrera, N., Marti Masso, J.F. 2008. Mutations in progranulin gene: clinical, pathological, and ribonucleic acid expression findings. *Biological psychiatry* 63(10), 946-52. doi:10.1016/j.biopsych.2007.08.015.
- Lund, M. 1994. Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. The Lund and Manchester Groups. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 57(4), 416-8.
- Luo, W., Dou, F., Rodina, A., Chip, S., Kim, J., Zhao, Q., Moulick, K., Aguirre, J., Wu, N., Greengard, P., Chiosis, G. 2007. Roles of heat-shock protein 90 in maintaining and facilitating the neurodegenerative phenotype in tauopathies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(22), 9511-6. doi:10.1073/pnas.0701055104.
- Mackenzie, I.R. 2007. The neuropathology and clinical phenotype of FTD with progranulin mutations. *Acta neuropathologica* 114(1), 49-54. doi:10.1007/s00401-007-0223-8.
- Mackenzie, I.R., Arzberger, T., Kremmer, E., Troost, D., Lorenzl, S., Mori, K., Weng, S.M., Haass, C., Kretschmar, H.A., Edbauer, D., Neumann, M. 2013. Dipeptide repeat protein pathology in C9ORF72 mutation cases: clinico-pathological correlations. *Acta neuropathologica*. doi:10.1007/s00401-013-1181-y.
- Mackenzie, I.R., Baborie, A., Pickering-Brown, S., Du Plessis, D., Jaros, E., Perry, R.H., Neary, D., Snowden, J.S., Mann, D.M. 2006a. Heterogeneity of ubiquitin pathology in frontotemporal lobar degeneration: classification and relation to clinical phenotype. *Acta neuropathologica* 112(5), 539-49. doi:10.1007/s00401-006-0138-9.
- Mackenzie, I.R., Baker, M., Pickering-Brown, S., Hsiung, G.Y., Lindholm, C., Dwosh, E., Gass, J., Cannon, A., Rademakers, R., Hutton, M., Feldman, H.H. 2006b. The neuropathology of frontotemporal lobar degeneration caused by mutations in the progranulin gene. *Brain : a journal of neurology* 129(Pt 11), 3081-90. doi:10.1093/brain/awl271.
- Mackenzie, I.R., Neumann, M., Baborie, A., Sampathu, D.M., Du Plessis, D., Jaros, E., Perry, R.H., Trojanowski, J.Q., Mann, D.M., Lee, V.M. 2011a. A harmonized classification system for FTLD-TDP pathology. *Acta neuropathologica* 122(1), 111-3. doi:10.1007/s00401-011-0845-8.
- Mackenzie, I.R., Neumann, M., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Alafuzoff, I., Kril, J., Kovacs, G.G., Ghetti, B., Halliday, G., Holm, I.E., Ince, P.G., Kamphorst, W., Revesz, T., Rozemuller, A.J., Kumar-Singh, S., Akiyama, H., Baborie, A., Spina, S., Dickson, D.W., Trojanowski, J.Q., Mann, D.M. 2009. Nomenclature for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: consensus recommendations. *Acta neuropathologica* 117(1), 15-8. doi:10.1007/s00401-008-0460-5.
- Mackenzie, I.R., Neumann, M., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Alafuzoff, I., Kril, J., Kovacs, G.G., Ghetti, B., Halliday, G., Holm, I.E., Ince, P.G., Kamphorst, W., Revesz, T., Rozemuller, A.J., Kumar-Singh, S., Akiyama, H., Baborie, A., Spina, S., Dickson, D.W., Trojanowski, J.Q., Mann, D.M. 2010. Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta neuropathologica* 119(1), 1-4. doi:10.1007/s00401-009-0612-2.

-
- Mackenzie, I.R., Neumann, M., Cairns, N.J., Munoz, D.G., Isaacs, A.M. 2011b. Novel types of frontotemporal lobar degeneration: beyond tau and TDP-43. *Journal of molecular neuroscience* : MN 45(3), 402-8. doi:10.1007/s12031-011-9551-1.
- Mackenzie, I.R., Shi, J., Shaw, C.L., Duplessis, D., Neary, D., Snowden, J.S., Mann, D.M. 2006c. Dementia lacking distinctive histology (DLDH) revisited. *Acta neuropathologica* 112(5), 551-9. doi:10.1007/s00401-006-0123-3.
- Magnani, E., Fan, J., Gasparini, L., Golding, M., Williams, M., Schiavo, G., Goedert, M., Amos, L.A., Spillantini, M.G. 2007. Interaction of tau protein with the dynactin complex. *The EMBO journal* 26(21), 4546-54. doi:10.1038/sj.emboj.7601878.
- Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Huang, Y. 2006. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(15), 5644-51. doi:10.1073/pnas.0600549103.
- Mahoney, C.J., Beck, J., Rohrer, J.D., Lashley, T., Mok, K., Shakespeare, T., Yeatman, T., Warrington, E.K., Schott, J.M., Fox, N.C., Rossor, M.N., Hardy, J., Collinge, J., Revesz, T., Mead, S., Warren, J.D. 2012. Frontotemporal dementia with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: clinical, neuroanatomical and neuropathological features. *Brain : a journal of neurology* 135(Pt 3), 736-50. doi:10.1093/brain/awr361.
- Malhotra, S., Baba, Y., Garrett, K.P., Staal, F.J., Gerstein, R., Kincade, P.W. 2008. Contrasting responses of lymphoid progenitors to canonical and noncanonical Wnt signals. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 181(6), 3955-64.
- Mandelkow, E.M., Mandelkow, E. 2012. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(7), a006247. doi:10.1101/cshperspect.a006247.
- Marchetti, B., Pluchino, S. 2013. Wnt your brain be inflamed? Yes, it Wnt! *Trends in molecular medicine* 19(3), 144-56. doi:10.1016/j.molmed.2012.12.001.
- Martens, L.H., Zhang, J., Barmada, S.J., Zhou, P., Kamiya, S., Sun, B., Min, S.W., Gan, L., Finkbeiner, S., Huang, E.J., Farese, R.V., Jr. 2012. Progranulin deficiency promotes neuroinflammation and neuron loss following toxin-induced injury. *The Journal of clinical investigation* 122(11), 3955-9. doi:10.1172/jci63113.
- Matias-Guiu, J.A., Garcia-Ramos, R. 2013. Primary progressive aphasia: from syndrome to disease. *Neurologia (Barcelona, Spain)* 28(6), 366-74. doi:10.1016/j.nrl.2012.04.003.
- Matsuoka, Y., Yang, J. 2012. Selective inhibition of extracellular signal-regulated kinases 1/2 blocks nerve growth factor to brain-derived neurotrophic factor signaling and suppresses the development of and reverses already established pain behavior in rats. *Neuroscience* 206, 224-36. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.01.002.
- Mazanetz, M.P., Fischer, P.M. 2007. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nature reviews Drug discovery* 6(6), 464-79. doi:10.1038/nrd2111.
- McDonald, K.K., Aulas, A., Destroismaisons, L., Pickles, S., Beleac, E., Camu, W., Rouleau, G.A., Vande Velde, C. 2011. TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of

- G3BP and TIA-1. *Human molecular genetics* 20(7), 1400-10. doi:10.1093/hmg/ddr021.
- McIlwain, D.R., Berger, T., Mak, T.W. 2013. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5(4), a008656. doi:10.1101/cshperspect.a008656.
- McKeith, I.G., Dickson, D.W., Lowe, J., Emre, M., O'Brien, J.T., Feldman, H., Cummings, J., Duda, J.E., Lippa, C., Perry, E.K., Aarsland, D., Arai, H., Ballard, C.G., Boeve, B., Burn, D.J., Costa, D., Del Ser, T., Dubois, B., Galasko, D., Gauthier, S., Goetz, C.G., Gomez-Tortosa, E., Halliday, G., Hansen, L.A., Hardy, J., Iwatsubo, T., Kalaria, R.N., Kaufer, D., Kenny, R.A., Korczyn, A., Kosaka, K., Lee, V.M., Lees, A., Litvan, I., Londos, E., Lopez, O.L., Minoshima, S., Mizuno, Y., Molina, J.A., Mukaetova-Ladinska, E.B., Pasquier, F., Perry, R.H., Schulz, J.B., Trojanowski, J.Q., Yamada, M. 2005. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology* 65(12), 1863-72. doi:10.1212/01.wnl.0000187889.17253.b1.
- McKhann, G.M., Albert, M.S., Grossman, M., Miller, B., Dickson, D., Trojanowski, J.Q. 2001. Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Archives of neurology* 58(11), 1803-9.
- McShea, A., Harris, P.L., Webster, K.R., Wahl, A.F., Smith, M.A. 1997. Abnormal expression of the cell cycle regulators P16 and CDK4 in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology* 150(6), 1933-9.
- Mega, M.S., Cummings, J.L. 1994. Frontal-subcortical circuits and neuropsychiatric disorders. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 6(4), 358-70.
- Mehta, S.G., Watts, G.D., Adamson, J.L., Hutton, M., Umberger, G., Xiong, S., Ramdeen, S., Lovell, M.A., Kimonis, V.E., Smith, C.D. 2007. APOE is a potential modifier gene in an autosomal dominant form of frontotemporal dementia (IBMPFD). *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 9(1), 9-13. doi:10.1097/GIM.0b013e31802d830d.
- Mendez, M.F. 2009. Frontotemporal dementia: therapeutic interventions. *Frontiers of neurology and neuroscience* 24, 168-78. doi:10.1159/000197896.
- Mendez, M.F., Shapira, J.S., McMurtry, A., Licht, E. 2007. Preliminary findings: behavioral worsening on donepezil in patients with frontotemporal dementia. *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 15(1), 84-7. doi:10.1097/01.jgp.0000231744.69631.33.
- Mendez, M.F., Shapira, J.S., Miller, B.L. 2005. Stereotypical movements and frontotemporal dementia. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 20(6), 742-5. doi:10.1002/mds.20465.
- Menu, E., Garcia, J., Huang, X., Di Liberto, M., Toogood, P.L., Chen, I., Vanderkerken, K., Chen-Kiang, S. 2008. A novel therapeutic combination using PD 0332991 and bortezomib: study in the 5T33MM myeloma model. *Cancer research* 68(14), 5519-23. doi:10.1158/0008-5472.can-07-6404.
- Mercado, P.A., Ayala, Y.M., Romano, M., Buratti, E., Baralle, F.E. 2005. Depletion of TDP 43 overrides the need for exonic and intronic splicing enhancers in the human apoA-II gene. *Nucleic acids research* 33(18), 6000-10. doi:10.1093/nar/gki897.

- Mesulam, M., Johnson, N., Krefft, T.A., Gass, J.M., Cannon, A.D., Adamson, J.L., Bigio, E.H., Weintraub, S., Dickson, D.W., Hutton, M.L., Graff-Radford, N.R. 2007. Progranulin mutations in primary progressive aphasia: the PPA1 and PPA3 families. *Archives of neurology* 64(1), 43-7. doi:10.1001/archneur.64.1.43.
- Miller, B.L., Ikonte, C., Ponton, M., Levy, M., Boone, K., Darby, A., Berman, N., Mena, I., Cummings, J.L. 1997. A study of the Lund-Manchester research criteria for frontotemporal dementia: clinical and single-photon emission CT correlations. *Neurology* 48(4), 937-42.
- Miller, B.L., Seeley, W.W., Mychack, P., Rosen, H.J., Mena, I., Boone, K. 2001. Neuroanatomy of the self: evidence from patients with frontotemporal dementia. *Neurology* 57(5), 817-21.
- Miller, J.N., Chan, C.H., Pearce, D.A. 2013. The role of nonsense-mediated decay in neuronal ceroid lipofuscinosis. *Human molecular genetics* 22(13), 2723-34. doi:10.1093/hmg/ddt120.
- Min, S.W., Cho, S.H., Zhou, Y., Schroeder, S., Haroutunian, V., Seeley, W.W., Huang, E.J., Shen, Y., Masliah, E., Mukherjee, C., Meyers, D., Cole, P.A., Ott, M., Gan, L. 2010. Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron* 67(6), 953-66. doi:10.1016/j.neuron.2010.08.044.
- Mittnacht, S. 1998. Control of pRB phosphorylation. *Current opinion in genetics & development* 8(1), 21-7.
- Mizuno, Y., Mochizuki, H., Sugita, Y., Goto, K. 1998. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Intern Med* 37(2), 192-3.
- Mizushima, N., Komatsu, M. 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147(4), 728-41. doi:10.1016/j.cell.2011.10.026.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451(7182), 1069-75. doi:10.1038/nature06639.
- Momeni, P., Rogaeva, E., Van Deerlin, V., Yuan, W., Grafman, J., Tierney, M., Huey, E., Bell, J., Morris, C.M., Kalaria, R.N., van Rensburg, S.J., Niehaus, D., Potocnik, F., Kawarai, T., Salehi-Rad, S., Sato, C., St George-Hyslop, P., Hardy, J. 2006. Genetic variability in CHMP2B and frontotemporal dementia. *Neuro-degenerative diseases* 3(3), 129-33. doi:10.1159/000094771.
- Monami, G., Gonzalez, E.M., Hellman, M., Gomella, L.G., Baffa, R., Iozzo, R.V., Morrione, A. 2006. Proepithelin promotes migration and invasion of 5637 bladder cancer cells through the activation of ERK1/2 and the formation of a paxillin/FAK/ERK complex. *Cancer research* 66(14), 7103-10. doi:10.1158/0008-5472.can-06-0633.
- Moreno, F., Indakoetxea, B., Barandiaran, M., Alzualde, A., Gabilondo, A., Estanga, A., Ruiz, J., Ruibal, M., Bergareche, A., Marti-Masso, J.F., Lopez de Munain, A. 2009. "Frontotemporoparietal" dementia: clinical phenotype associated with the c.709-1G>A PGRN mutation. *Neurology* 73(17), 1367-74. doi:10.1212/WNL.Ob013e3181bd82a7.
- Moreno, F., Sala-Llloch, R., Barandiaran, M., Sanchez-Valle, R., Estanga, A., Bartres-Faz, D., Sistiaga, A., Alzualde, A., Fernandez, E., Marti Masso, J.F., Lopez de Munain, A., Indakoetxea, B. 2013. Distinctive age-related temporal cortical thinning in asymptomatic granulin gene mutation carriers. *Neurobiology of aging* 34(5), 1462-

8. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.11.005.

Moretti, R., Torre, P., Antonello, R.M., Cazzato, G., Bava, A. 2003. Frontotemporal dementia: paroxetine as a possible treatment of behavior symptoms. A randomized, controlled, open 14-month study. *European neurology* 49(1), 13-9. doi:67021.

Morillo, S.M., Abanto, E.P., Roman, M.J., Frade, J.M. 2012. Nerve growth factor-induced cell cycle reentry in newborn neurons is triggered by p38MAPK-dependent E2F4 phosphorylation. *Molecular and cellular biology* 32(14), 2722-37. doi:10.1128/mcb.00239-12.

Morlando, M., Dini Modigliani, S., Torrelli, G., Rosa, A., Di Carlo, V., Caffarelli, E., Bozzoni, I. 2012. FUS stimulates microRNA biogenesis by facilitating co-transcriptional Drosha recruitment. *The EMBO journal* 31(24), 4502-10. doi:10.1038/emboj.2012.319.

Moujalled, D., James, J.L., Parker, S.J., Lidgerwood, G.E., Duncan, C., Meyerowitz, J., Nonaka, T., Hasegawa, M., Kanninen, K.M., Grubman, A., Liddell, J.R., Crouch, P.J., White, A.R. 2013. Kinase Inhibitor Screening Identifies Cyclin-Dependent Kinases and Glycogen Synthase Kinase 3 as Potential Modulators of TDP-43 Cytosolic Accumulation during Cell Stress. *PloS one* 8(6), e67433. doi:10.1371/journal.pone.0067433.

Mukherjee, O., Wang, J., Gitcho, M., Chakraverty, S., Taylor-Reinwald, L., Shears, S., Kauwe, J.S., Norton, J., Levitch, D., Bigio, E.H., Hatanpaa, K.J., White, C.L., Morris, J.C., Cairns, N.J., Goate, A. 2008. Molecular characterization of novel progranulin (GRN) mutations in frontotemporal dementia. *Human mutation* 29(4), 512-21. doi:10.1002/humu.20681.

Munoz, U., Bartolome, F., Bermejo, F., Martin-Requero, A. 2008. Enhanced proteasome-dependent degradation of the CDK inhibitor p27(kip1) in immortalized lymphocytes from Alzheimer's dementia patients. *Neurobiology of aging* 29(10), 1474-84.

Murphy, S.P., Lee, R.J., McClean, M.E., Pemberton, H.E., Uo, T., Morrison, R.S., Bastian, C., Baltan, S. 2013. MS-275, a Class I histone deacetylase inhibitor, protects the p53-deficient mouse against ischemic injury. *Journal of neurochemistry*. doi:10.1111/jnc.12498.

Murray, A.W. 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116(2), 221-34.

Myers, A.J., Pittman, A.M., Zhao, A.S., Rohrer, K., Kaleem, M., Marlowe, L., Lees, A., Leung, D., McKeith, I.G., Perry, R.H., Morris, C.M., Trojanowski, J.Q., Clark, C., Karlawish, J., Arnold, S., Forman, M.S., Van Deerlin, V., de Silva, R., Hardy, J. 2007. The MAPT H1c risk haplotype is associated with increased expression of tau and especially of 4 repeat containing transcripts. *Neurobiology of disease* 25(3), 561-70. doi:10.1016/j.nbd.2006.10.018.

Naderi, J., Lopez, C., Pandey, S. 2006. Chronically increased oxidative stress in fibroblasts from Alzheimer's disease patients causes early senescence and renders resistance to apoptosis by oxidative stress. *Mechanisms of ageing and development* 127(1), 25-35. doi:10.1016/j.mad.2005.08.006.

Nagy, Z., Combrinck, M., Budge, M., McShane, R. 2002. Cell cycle kinesis in lymphocytes in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* 317(2), 81-4.

- Nagy, Z., Esiri, M.M., Smith, A.D. 1997. Expression of cell division markers in the hippocampus in Alzheimer's disease and other neurodegenerative conditions. *Acta neuropathologica* 93(3), 294-300.
- Neary, D., Snowden, J., Mann, D. 2005. Frontotemporal dementia. *Lancet neurology* 4(11), 771-80. doi:10.1016/s1474-4422(05)70223-4.
- Neary, D., Snowden, J.S., Gustafson, L., Passant, U., Stuss, D., Black, S., Freedman, M., Kertesz, A., Robert, P.H., Albert, M., Boone, K., Miller, B.L., Cummings, J., Benson, D.F. 1998. Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 51(6), 1546-54.
- Neary, D., Snowden, J.S., Northen, B., Goulding, P. 1988. Dementia of frontal lobe type. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 51(3), 353-61.
- Nedachi, T., Kawai, T., Matsuwaki, T., Yamanouchi, K., Nishihara, M. 2011. Progranulin enhances neural progenitor cell proliferation through glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation. *Neuroscience* 185, 106-15. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.04.037.
- Neumann, M. 2013. Frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis: Molecular similarities and differences. *Revue neurologique* 169(10), 793-8. doi:10.1016/j.neurol.2013.07.019.
- Neumann, M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Vanmassenhove, B., Kretzschmar, H.A., Van Deerlin, V.M., Clark, C.M., Grossman, M., Miller, B.L., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. 2007a. TDP-43-positive white matter pathology in frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 66(3), 177-83. doi:10.1097/01.jnen.0000248554.45456.58.
- Neumann, M., Mackenzie, I.R., Cairns, N.J., Boyer, P.J., Markesbery, W.R., Smith, C.D., Taylor, J.P., Kretzschmar, H.A., Kimonis, V.E., Forman, M.S. 2007b. TDP-43 in the ubiquitin pathology of frontotemporal dementia with VCP gene mutations. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 66(2), 152-7. doi:10.1097/nen.0b013e31803020b9.
- Neumann, M., Rademakers, R., Roeber, S., Baker, M., Kretzschmar, H.A., Mackenzie, I.R. 2009a. A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain : a journal of neurology* 132(Pt 11), 2922-31. doi:10.1093/brain/awp214.
- Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., McCluskey, L.F., Miller, B.L., Masliah, E., Mackenzie, I.R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H.A., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. 2006. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, NY)* 314(5796), 130-3. doi:10.1126/science.1134108.
- Neumann, M., Tolnay, M., Mackenzie, I.R. 2009b. The molecular basis of frontotemporal dementia. *Expert reviews in molecular medicine* 11, e23. doi:10.1017/s1462399409001136.
- Nguyen, A.D., Nguyen, T.A., Martens, L.H., Mitic, L.L., Farese, R.V., Jr. 2013. Progranulin: at the interface of neurodegenerative and metabolic diseases. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. doi:10.1016/j.tem.2013.08.003.

- Nguyen, M.D., Mushynski, W.E., Julien, J.P. 2002. Cycling at the interface between neurodevelopment and neurodegeneration. *Cell death and differentiation* 9(12), 1294-306. doi:10.1038/sj.cdd.4401108.
- Nishihira, Y., Tan, C.F., Onodera, O., Toyoshima, Y., Yamada, M., Morita, T., Nishizawa, M., Kakita, A., Takahashi, H. 2008. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: two pathological patterns shown by analysis of distribution of TDP-43-immunoreactive neuronal and glial cytoplasmic inclusions. *Acta neuropathologica* 116(2), 169-82. doi:10.1007/s00401-008-0385-z.
- Noble, W., Hanger, D.P., Gallo, J.M. 2010. Transgenic mouse models of tauopathy in drug discovery. *CNS & neurological disorders drug targets* 9(4), 403-28.
- Nonaka, T., Arai, T., Buratti, E., Baralle, F.E., Akiyama, H., Hasegawa, M. 2009a. Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTLD-U are recapitulated in SH-SY5Y cells. *FEBS letters* 583(2), 394-400. doi:10.1016/j.febslet.2008.12.031.
- Nonaka, T., Kametani, F., Arai, T., Akiyama, H., Hasegawa, M. 2009b. Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Human molecular genetics* 18(18), 3353-64. doi:10.1093/hmg/ddp275.
- Nonaka, T., Masuda-Suzukake, M., Arai, T., Hasegawa, Y., Akatsu, H., Obi, T., Yoshida, M., Murayama, S., Mann, D.M., Akiyama, H., Hasegawa, M. 2013. Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell reports* 4(1), 124-34. doi:10.1016/j.celrep.2013.06.007.
- Nykjaer, A., Willnow, T.E. 2012. Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends in neurosciences* 35(4), 261-70. doi:10.1016/j.tins.2012.01.003.
- Odagiri, S., Tanji, K., Mori, F., Miki, Y., Kakita, A., Takahashi, H., Wakabayashi, K. 2013. Brain expression level and activity of HDAC6 protein in neurodegenerative dementia. *Biochemical and biophysical research communications* 430(1), 394-9. doi:10.1016/j.bbrc.2012.11.034.
- Odawara, T., Shiozaki, K., Iseki, E., Hino, H., Kosaka, K. 2003. Alterations of muscarinic acetylcholine receptors in atypical Pick's disease without Pick bodies. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 74(7), 965-7.
- Ong, C.H., Bateman, A. 2003. Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell derived growth factor, acrogranin) in proliferation and tumorigenesis. *Histology and histopathology* 18(4), 1275-88.
- Orozco, D., Edbauer, D. 2013. FUS-mediated alternative splicing in the nervous system: consequences for ALS and FTLD. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. doi:10.1007/s00109-013-1077-2.
- Ou, S.H., Wu, F., Harrich, D., Garcia-Martinez, L.F., Gaynor, R.B. 1995. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *Journal of virology* 69(6), 3584-96.
- Ozcelik, S., Fraser, G., Castets, P., Schaeffer, V., Skachokova, Z., Breu, K., Clavaguera, F., Sinnreich, M., Kappos, L., Goedert, M., Tolnay, M., Winkler, D.T. 2013. Rapamycin attenuates the progression of tau pathology in

- P301S tau transgenic mice. *PLoS one* 8(5), e62459. doi:10.1371/journal.pone.0062459.
- Padmanabhan, J., Park, D.S., Greene, L.A., Shelanski, M.L. 1999. Role of cell cycle regulatory proteins in cerebellar granule neuron apoptosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19(20), 8747-56.
- Palmieri, D., Lockman, P.R., Thomas, F.C., Hua, E., Herring, J., Hargrave, E., Johnson, M., Flores, N., Qian, Y., Vega-Valle, E., Taskar, K.S., Rudraraju, V., Mittapalli, R.K., Gaasch, J.A., Bohn, K.A., Thorsheim, H.R., Liewehr, D.J., Davis, S., Reilly, J.F., Walker, R., Bronder, J.L., Feigenbaum, L., Steinberg, S.M., Camphausen, K., Meltzer, P.S., Richon, V.M., Smith, Q.R., Steeg, P.S. 2009. Vorinostat inhibits brain metastatic colonization in a model of triple-negative breast cancer and induces DNA double-strand breaks. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15(19), 6148-57. doi:10.1158/1078-0432.ccr-09-1039.
- Pan, X.D., Chen, X.C. 2013. Clinic, neuropathology and molecular genetics of frontotemporal dementia: a mini-review. *Translational neurodegeneration* 2(1), 8. doi:10.1186/2047-9158-2-8.
- Panda, D., Samuel, J.C., Massie, M., Feinstein, S.C., Wilson, L. 2003. Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four-repeat tau: implications for the onset of neurodegenerative disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(16), 9548-53. doi:10.1073/pnas.1633508100.
- Park, K.H., Hallows, J.L., Chakrabarty, P., Davies, P., Vincent, I. 2007. Conditional neuronal simian virus 40 T antigen expression induces Alzheimer-like tau and amyloid pathology in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27(11), 2969-78. doi:10.1523/jneurosci.0186-07.2007.
- Parker, S.J., Meyerowitz, J., James, J.L., Liddell, J.R., Crouch, P.J., Kanninen, K.M., White, A.R. 2012. Endogenous TDP-43 localized to stress granules can subsequently form protein aggregates. *Neurochemistry international* 60(4), 415-24. doi:10.1016/j.neuint.2012.01.019.
- Parkinson, N., Ince, P.G., Smith, M.O., Highley, R., Skibinski, G., Andersen, P.M., Morrison, K.E., Pall, H.S., Hardiman, O., Collinge, J., Shaw, P.J., Fisher, E.M. 2006. ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology* 67(6), 1074-7. doi:10.1212/01.wnl.0000231510.89311.8b.
- Pasquier, F., Deramecourt, V., Lebert, F. 2012. [From Pick's disease to frontotemporal dementia]. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine* 196(2), 431-42; discussion 42-3.
- Petoukhov, E., Fernando, S., Mills, F., Shivji, F., Hunter, D., Krieger, C., Silverman, M.A., Bamji, S.X. 2013. Activity-dependent secretion of progranulin from synapses. *Journal of cell science*. doi:10.1242/jcs.132076.
- Pickering-Brown, S.M., Baker, M., Nonaka, T., Ikeda, K., Sharma, S., Mackenzie, J., Simpson, S.A., Moore, J.W., Snowden, J.S., de Silva, R., Revesz, T., Hasegawa, M., Hutton, M., Mann, D.M. 2004. Frontotemporal dementia with Pick-type histology associated with Q336R mutation in the tau gene. *Brain : a journal of neurology* 127(Pt 6), 1415-26. doi:10.1093/brain/awh147.

- Piscopo, P., Rivabene, R., Adduci, A., Mallozzi, C., Malvezzi-Campeggi, L., Crestini, A., Confaloni, A. 2010. Hypoxia induces up-regulation of progranulin in neuroblastoma cell lines. *Neurochemistry international* 57(8), 893-8. doi:10.1016/j.neuint.2010.09.008.
- Polymenidou, M., Lagier-Tourenne, C., Hutt, K.R., Huelga, S.C., Moran, J., Liang, T.Y., Ling, S.C., Sun, E., Wancewicz, E., Mazur, C., Kordasiewicz, H., Sedaghat, Y., Donohue, J.P., Shiue, L., Bennett, C.F., Yeo, G.W., Cleveland, D.W. 2011. Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nature neuroscience* 14(4), 459-68. doi:10.1038/nn.2779.
- Poorkaj, P., Bird, T.D., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R.M., Anderson, L., Andreadis, A., Wiederholt, W.C., Raskind, M., Schellenberg, G.D. 1998. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Annals of neurology* 43(6), 815-25. doi:10.1002/ana.410430617.
- Poorkaj, P., Muma, N.A., Zhukareva, V., Cochran, E.J., Shannon, K.M., Hurtig, H., Koller, W.C., Bird, T.D., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., Schellenberg, G.D. 2002. An R5L tau mutation in a subject with a progressive supranuclear palsy phenotype. *Annals of neurology* 52(4), 511-6. doi:10.1002/ana.10340.
- Procter, A.W., Qurne, M., Francis, P.T. 1999. Neurochemical features of frontotemporal dementia. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 10 Suppl 1, 80-4. doi:51219.
- Puttaraju, M., Jamison, S.F., Mansfield, S.G., Garcia-Blanco, M.A., Mitchell, L.G. 1999. Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy. *Nature biotechnology* 17(3), 246-52. doi:10.1038/6986.
- Rabinovici, G.D., Miller, B.L. 2010. Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management. *CNS drugs* 24(5), 375-98. doi:10.2165/11533100-000000000-00000.
- Rademakers, R., Melquist, S., Cruts, M., Theuns, J., Del-Favero, J., Poorkaj, P., Baker, M., Sleegers, K., Crook, R., De Pooter, T., Bel Kacem, S., Adamson, J., Van den Bossche, D., Van den Broeck, M., Gass, J., Corsmit, E., De Rijk, P., Thomas, N., Engelborghs, S., Heckman, M., Litvan, I., Crook, J., De Deyn, P.P., Dickson, D., Schellenberg, G.D., Van Broeckhoven, C., Hutton, M.L. 2005. High-density SNP haplotyping suggests altered regulation of tau gene expression in progressive supranuclear palsy. *Human molecular genetics* 14(21), 3281-92. doi:10.1093/hmg/ddi361.
- Rademakers, R., Neumann, M., Mackenzie, I.R. 2012. Advances in understanding the molecular basis of frontotemporal dementia. *Nature reviews Neurology* 8(8), 423-34. doi:10.1038/nrneurol.2012.117.
- Rademakers, R., Rovelet-Lecrux, A. 2009. Recent insights into the molecular genetics of dementia. *Trends in neurosciences* 32(8), 451-61. doi:10.1016/j.tins.2009.05.005.
- Rahman, S., Robbins, T.W., Hodges, J.R., Mehta, M.A., Nestor, P.J., Clark, L., Sahakian, B.J. 2006. Methylphenidate ('Ritalin') can ameliorate abnormal risk-taking behavior in the frontal variant of frontotemporal dementia. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 31(3), 651-8. doi:10.1038/sj.npp.1300886.

- Ramsden, M., Kotilinek, L., Forster, C., Paulson, J., McGowan, E., SantaCruz, K., Guimaraes, A., Yue, M., Lewis, J., Carlson, G., Hutton, M., Ashe, K.H. 2005. Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L). *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25(46), 10637-47. doi:10.1523/jneurosci.3279-05.2005.
- Rao, V.K., Carlson, E.A., Yan, S.S. 2013. Mitochondrial permeability transition pore is a potential drug target for neurodegeneration. *Biochimica et biophysica acta*. doi:10.1016/j.bbadis.2013.09.003.
- Rascovsky, K., Hodges, J.R., Knopman, D., Mendez, M.F., Kramer, J.H., Neuhaus, J., van Swieten, J.C., Seelaar, H., Dopper, E.G., Onyike, C.U., Hillis, A.E., Josephs, K.A., Boeve, B.F., Kertesz, A., Seeley, W.W., Rankin, K.P., Johnson, J.K., Gorno-Tempini, M.L., Rosen, H., Prileau-Latham, C.E., Lee, A., Kipps, C.M., Lillo, P., Piguet, O., Rohrer, J.D., Rossor, M.N., Warren, J.D., Fox, N.C., Galasko, D., Salmon, D.P., Black, S.E., Mesulam, M., Weintraub, S., Dickerson, B.C., Diehl-Schmid, J., Pasquier, F., Deramecourt, V., Lebert, F., Pijnenburg, Y., Chow, T.W., Manes, F., Grafman, J., Cappa, S.F., Freedman, M., Grossman, M., Miller, B.L. 2011. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain : a journal of neurology* 134(Pt 9), 2456-77. doi:10.1093/brain/awr179.
- Ratnavalli, E., Brayne, C., Dawson, K., Hodges, J.R. 2002. The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology* 58(11), 1615-21.
- Ravikumar, B., Rubinsztein, D.C. 2004. Can autophagy protect against neurodegeneration caused by aggregate-prone proteins? *Neuroreport* 15(16), 2443-5.
- Rayaprolu, S., Fujioka, S., Traynor, S., Soto-Ortolaza, A.I., Petrucelli, L., Dickson, D.W., Rademakers, R., Boylan, K.B., Graff-Radford, N.R., Uitti, R.J., Wszolek, Z.K., Ross, O.A. 2013. TARDBP mutations in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 19(3), 312-5. doi:10.1016/j.parkreldis.2012.11.003.
- Reed, D.A., Johnson, N.A., Thompson, C., Weintraub, S., Mesulam, M.M. 2004. A clinical trial of bromocriptine for treatment of primary progressive aphasia. *Annals of neurology* 56(5), 750. doi:10.1002/ana.20301.
- Reisberg, B., Doody, R., Stoffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., Mobius, H.J. 2003. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine* 348(14), 1333-41. doi:10.1056/NEJMoa013128.
- Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simon-Sanchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., Kalimo, H., Paetau, A., Abramzon, Y., Remes, A.M., Kaganovich, A., Scholz, S.W., Duckworth, J., Ding, J., Harmer, D.W., Hernandez, D.G., Johnson, J.O., Mok, K., Ryten, M., Trabzuni, D., Guerreiro, R.J., Orrell, R.W., Neal, J., Murray, A., Pearson, J., Jansen, I.E., Sondervan, D., Seelaar, H., Blake, D., Young, K., Halliwell, N., Callister, J.B., Toulson, G., Richardson, A., Gerhard, A., Snowden, J., Mann, D., Neary, D., Nalls, M.A., Peuralinna, T., Jansson, L., Isoviita, V.M., Kaivorinne, A.L., Holtta-Vuori, M., Ikonen, E., Sulkava, R., Benatar, M., Wu, J., Chio, A., Restagno, G., Borghero, G., Sabatelli, M., Heckerman, D., Rogaeva, E., Zinman, L., Rothstein, J.D., Sendtner, M., Drepper, C., Eichler, E.E., Alkan, C., Abdullaev, Z., Pack, S.D., Dutra, A., Pak, E., Hardy, J., Singleton, A., Williams, N.M., Heutink, P., Pickering-Brown, S., Morris, H.R., Tienari, P.J., Traynor, B.J. 2011. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72(2), 257-68. doi:10.1016/j.neuron.2011.09.010.
- Ricobaraza, A., Cuadrado-Tejedor, M., Marco, S., Perez-Otano, I., Garcia-Osta, A. 2012. Phenylbutyrate rescues dendritic spine loss associated with memory deficits in a mouse model of Alzheimer disease. *Hippocampus*

22(5), 1040-50. doi:10.1002/hipo.20883.

Richet, E., Pooler, A.M., Rodriguez, T., Novoselov, S.S., Schmidtke, G., Groettrup, M., Hanger, D.P., Cheetham, M.E., van der Spuy, J. 2012. NUB1 modulation of GSK3beta reduces tau aggregation. *Human molecular genetics* 21(24), 5254-67. doi:10.1093/hmg/dds376.

Rinne, J.O., Laine, M., Kaasinen, V., Norvasuo-Heila, M.K., Nagren, K., Helenius, H. 2002. Striatal dopamine transporter and extrapyramidal symptoms in frontotemporal dementia. *Neurology* 58(10), 1489-93.

Rodriguez-Martin, T., Garcia-Blanco, M.A., Mansfield, S.G., Grover, A.C., Hutton, M., Yu, Q., Zhou, J., Anderton, B.H., Gallo, J.M. 2005. Reprogramming of tau alternative splicing by spliceosome-mediated RNA trans-splicing: implications for tauopathies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(43), 15659-64. doi:10.1073/pnas.0503150102.

Rohn, T.T. 2009. Cytoplasmic inclusions of TDP-43 in neurodegenerative diseases: a potential role for caspases. *Histology and histopathology* 24(8), 1081-6.

Rosen, E.Y., Wexler, E.M., Versano, R., Coppola, G., Gao, F., Winden, K.D., Oldham, M.C., Martens, L.H., Zhou, P., Farese, R.V., Jr., Geschwind, D.H. 2011. Functional genomic analyses identify pathways dysregulated by progranulin deficiency, implicating Wnt signaling. *Neuron* 71(6), 1030-42. doi:10.1016/j.neuron.2011.07.021.

Rosen, H.J., Allison, S.C., Ogar, J.M., Amici, S., Rose, K., Dronkers, N., Miller, B.L., Gorno-Tempini, M.L. 2006. Behavioral features in semantic dementia vs other forms of progressive aphasia. *Neurology* 67(10), 1752-6. doi:10.1212/01.wnl.0000247630.29222.34.

Rosen, H.J., Cummings, J. 2007. A real reason for patients with pseudobulbar affect to smile. *Annals of neurology* 61(2), 92-6. doi:10.1002/ana.21056.

Rossi, G., Conconi, D., Panzeri, E., Redaelli, S., Piccoli, E., Paoletta, L., Dalpra, L., Tagliavini, F. 2013. Mutations in MAPT gene cause chromosome instability and introduce copy number variations widely in the genome. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 33(4), 969-82. doi:10.3233/jad-2012-121633.

Rossi, G., Dalpra, L., Crosti, F., Lissoni, S., Sciacca, F.L., Catania, M., Di Fede, G., Mangieri, M., Giaccone, G., Croci, D., Tagliavini, F. 2008. A new function of microtubule-associated protein tau: involvement in chromosome stability. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 7(12), 1788-94.

Roth, K.A. 2001. Caspases, apoptosis, and Alzheimer disease: causation, correlation, and confusion. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 60(9), 829-38.

Ryan, C.L., Baranowski, D.C., Chitramuthu, B.P., Malik, S., Li, Z., Cao, M., Minotti, S., Durham, H.D., Kay, D.G., Shaw, C.A., Bennett, H.P., Bateman, A. 2009. Progranulin is expressed within motor neurons and promotes neuronal cell survival. *BMC neuroscience* 10, 130. doi:10.1186/1471-2202-10-130.

S. O'Neill, M.A., V. de Simone. 2006. Demencia Semántica, una enfermedad de muchas palabras. *Revista de neurologia* 43(11), 685-9.

Sagarra Mur, D., Olivan Usieto, J.A. 2010. [Frontotemporal dementia and motor neuron disease]. *Neurologia*

(Barcelona, Spain) 25(1), 62-3.

- Sager, J.J., Bai, Q., Burton, E.A. 2010. Transgenic zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Brain structure & function* 214(2-3), 285-302. doi:10.1007/s00429-009-0237-1.
- Sampathu, D.M., Neumann, M., Kwong, L.K., Chou, T.T., Micsenyi, M., Truax, A., Bruce, J., Grossman, M., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. 2006. Pathological heterogeneity of frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions delineated by ubiquitin immunohistochemistry and novel monoclonal antibodies. *The American journal of pathology* 169(4), 1343-52. doi:10.2353/ajpath.2006.060438.
- Santacruz, K., Lewis, J., Spire, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., DeTure, M., Ramsden, M., McGowan, E., Forster, C., Yue, M., Orne, J., Janus, C., Mariash, A., Kuskowski, M., Hyman, B., Hutton, M., Ashe, K.H. 2005. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* (New York, NY) 309(5733), 476-81. doi:10.1126/science.1113694.
- Santos, R.X., Correia, S.C., Carvalho, C., Cardoso, S., Santos, M.S., Moreira, P.I. 2011. Mitophagy in neurodegeneration: an opportunity for therapy? *Current drug targets* 12(6), 790-9.
- Schwartz, J.C., Ebmeier, C.C., Podell, E.R., Heimiller, J., Taatjes, D.J., Cech, T.R. 2012. FUS binds the CTD of RNA polymerase II and regulates its phosphorylation at Ser2. *Genes & development* 26(24), 2690-5. doi:10.1101/gad.204602.112.
- See, T.M., LaMarre, A.K., Lee, S.E., Miller, B.L. 2010. Genetic causes of frontotemporal degeneration. *Journal of geriatric psychiatry and neurology* 23(4), 260-8. doi:10.1177/0891988710383574.
- Seelaar, H., Klijnsma, K.Y., de Koning, I., van der Lugt, A., Chiu, W.Z., Azmani, A., Rozemuller, A.J., van Swieten, J.C. 2010. Frequency of ubiquitin and FUS-positive, TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration. *Journal of neurology* 257(5), 747-53. doi:10.1007/s00415-009-5404-z.
- Seelaar, H., Rohrer, J.D., Pijnenburg, Y.A., Fox, N.C., van Swieten, J.C. 2011. Clinical, genetic and pathological heterogeneity of frontotemporal dementia: a review. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 82(5), 476-86. doi:10.1136/jnnp.2010.212225.
- Seeley, W.W., Bauer, A.M., Miller, B.L., Gorno-Tempini, M.L., Kramer, J.H., Weiner, M., Rosen, H.J. 2005. The natural history of temporal variant frontotemporal dementia. *Neurology* 64(8), 1384-90. doi:10.1212/01.wnl.0000158425.46019.5c.
- Seeley, W.W., Carlin, D.A., Allman, J.M., Macedo, M.N., Bush, C., Miller, B.L., Dearmond, S.J. 2006. Early frontotemporal dementia targets neurons unique to apes and humans. *Annals of neurology* 60(6), 660-7. doi:10.1002/ana.21055.
- Seilhean, D., Bielle, F., Plu, I., Duyckaerts, C. 2013. Frontotemporal lobar degeneration: Diversity of FTLD lesions. *Revue neurologique*. doi:10.1016/j.neurol.2013.07.015.
- Sephton, C.F., Cenik, C., Kucukural, A., Dammer, E.B., Cenik, B., Han, Y., Dewey, C.M., Roth, F.P., Herz, J., Peng, J., Moore, M.J., Yu, G. 2011. Identification of neuronal RNA targets of TDP-43-containing ribonucleoprotein

- complexes. *The Journal of biological chemistry* 286(2), 1204-15. doi:10.1074/jbc.M110.190884.
- Sephton, C.F., Good, S.K., Atkin, S., Dewey, C.M., Mayer, P., 3rd, Herz, J., Yu, G. 2010. TDP-43 is a developmentally regulated protein essential for early embryonic development. *The Journal of biological chemistry* 285(9), 6826-34. doi:10.1074/jbc.M109.061846.
- Serra-Mestres, J. 2001. Síndromes Degenerativos Focales. *Manual de demencias* (Prous Science Ediciones), 374-83.
- Seward, M.E., Swanson, E., Norambuena, A., Reimann, A., Cochran, J.N., Li, R., Roberson, E.D., Bloom, G.S. 2013. Amyloid-beta signals through tau to drive ectopic neuronal cell cycle re-entry in Alzheimer's disease. *Journal of cell science* 126(Pt 5), 1278-86. doi:10.1242/jcs.1125880.
- Shankaran, S.S., Capell, A., Hruscha, A.T., Fellerer, K., Neumann, M., Schmid, B., Haass, C. 2008. Missense mutations in the progranulin gene linked to frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-immunoreactive inclusions reduce progranulin production and secretion. *The Journal of biological chemistry* 283(3), 1744-53. doi:10.1074/jbc.M705115200.
- Sheinerman, K.S., Umansky, S.R. 2013. Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies. *Frontiers in cellular neuroscience* 7, 150. doi:10.3389/fncel.2013.00150.
- Short, R.A., Broderick, D.F., Patton, A., Arvanitakis, Z., Graff-Radford, N.R. 2005. Different patterns of magnetic resonance imaging atrophy for frontotemporal lobar degeneration syndromes. *Archives of neurology* 62(7), 1106-10. doi:10.1001/archneur.62.7.1106.
- Shoyab, M., McDonald, V.L., Byles, C., Todaro, G.J., Plowman, G.D. 1990. Epithelins 1 and 2: isolation and characterization of two cysteine-rich growth-modulating proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(20), 7912-6.
- Shulman, R.G., Rothman, D.L., Behar, K.L., Hyder, F. 2004. Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. *Trends in neurosciences* 27(8), 489-95. doi:10.1016/j.tins.2004.06.005.
- Sieben, A., Van Langenhove, T., Engelborghs, S., Martin, J.J., Boon, P., Cras, P., De Deyn, P.P., Santens, P., Van Broeckhoven, C., Cruts, M. 2012. The genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration. *Acta neuropathologica* 124(3), 353-72. doi:10.1007/s00401-012-1029-x.
- Silva-Alvarez, C., Arrazola, M.S., Godoy, J.A., Ordenes, D., Inestrosa, N.C. 2013. Canonical Wnt signaling protects hippocampal neurons from Abeta oligomers: role of non-canonical Wnt-5a/Ca(2+) in mitochondrial dynamics. *Frontiers in cellular neuroscience* 7, 97. doi:10.3389/fncel.2013.00097.
- Sjogren, M., Minthon, L., Passant, U., Blennow, K., Wallin, A. 1998. Decreased monoamine metabolites in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 19(5), 379-84.
- Skibinski, G., Parkinson, N.J., Brown, J.M., Chakrabarti, L., Lloyd, S.L., Hummerich, H., Nielsen, J.E., Hodges, J.R., Spillantini, M.G., Thusgaard, T., Brandner, S., Brun, A., Rossor, M.N., Gade, A., Johannsen, P., Sorensen, S.A.,

- Gydesen, S., Fisher, E.M., Collinge, J. 2005. Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nature genetics* 37(8), 806-8. doi:10.1038/ng1609.
- Slegers, K., Brouwers, N., Van Broeckhoven, C. 2010. Role of progranulin as a biomarker for Alzheimer's disease. *Biomarkers in medicine* 4(1), 37-50.
- Smith, K.R., Damiano, J., Franceschetti, S., Carpenter, S., Canafoglia, L., Morbin, M., Rossi, G., Pareyson, D., Mole, S.E., Staropoli, J.F., Sims, K.B., Lewis, J., Lin, W.L., Dickson, D.W., Dahl, H.H., Bahlo, M., Berkovic, S.F. 2012. Strikingly different clinicopathological phenotypes determined by progranulin-mutation dosage. *American journal of human genetics* 90(6), 1102-7. doi:10.1016/j.ajhg.2012.04.021.
- Smith, T.W., Lippa, C.F. 1995. Ki-67 immunoreactivity in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 54(3), 297-303.
- Snowden, J.S., Pickering-Brown, S.M., Mackenzie, I.R., Richardson, A.M., Varma, A., Neary, D., Mann, D.M. 2006. Progranulin gene mutations associated with frontotemporal dementia and progressive non-fluent aphasia. *Brain : a journal of neurology* 129(Pt 11), 3091-102. doi:10.1093/brain/awl267.
- Solomon, V.R., Lee, H. 2009. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *European journal of pharmacology* 625(1-3), 220-33. doi:10.1016/j.ejphar.2009.06.063.
- Song, M., Kwon, Y.A., Lee, Y., Kim, H., Yun, J.H., Kim, S., Kim, D.K. 2012. G1/S cell cycle checkpoint defect in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease. *Psychiatry investigation* 9(4), 413-7. doi:10.4306/pi.2012.9.4.413.
- Spillantini, M.G., Goedert, M. 2013. Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet neurology* 12(6), 609-22. doi:10.1016/s1474-4422(13)70090-5.
- Spillantini, M.G., Murrell, J.R., Goedert, M., Farlow, M.R., Klug, A., Ghetti, B. 1998. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(13), 7737-41.
- Stanford, P.M., Shepherd, C.E., Halliday, G.M., Brooks, W.S., Schofield, P.W., Brodaty, H., Martins, R.N., Kwok, J.B., Schofield, P.R. 2003. Mutations in the tau gene that cause an increase in three repeat tau and frontotemporal dementia. *Brain : a journal of neurology* 126(Pt 4), 814-26.
- Stark, A.L., Dolan, M.E. 2013. Lymphoblastoid cell lines in pharmacogenomics: how applicable are they to clinical outcomes? *Pharmacogenomics* 14(5), 447-50. doi:10.2217/pgs.13.32.
- Stefanis, L., Park, D.S., Friedman, W.J., Greene, L.A. 1999. Caspase-dependent and -independent death of camptothecin-treated embryonic cortical neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19(15), 6235-47.
- Steinacker, P., Hendrich, C., Sperfeld, A.D., Jesse, S., von Arnim, C.A., Lehnert, S., Pabst, A., Uttner, I., Tumani,

- H., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Kretschmar, H.A., Ludolph, A., Neumann, M., Otto, M. 2008. TDP-43 in cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of neurology* 65(11), 1481-7. doi:10.1001/archneur.65.11.1481.
- Steinitz, M., Klein, G. 1980. EBV-transformation of surface IgA-positive human lymphocytes. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) 125(1), 194-6.
- Stone, J.G., Siedlak, S.L., Tabaton, M., Hirano, A., Castellani, R.J., Santocanale, C., Perry, G., Smith, M.A., Zhu, X., Lee, H.G. 2011. The cell cycle regulator phosphorylated retinoblastoma protein is associated with tau pathology in several tauopathies. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 70(7), 578-87. doi:10.1097/NEN.0b013e3182204414.
- Strong, M.J., Volkening, K., Hammond, R., Yang, W., Strong, W., Leystra-Lantz, C., Shoesmith, C. 2007. TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein. *Molecular and cellular neurosciences* 35(2), 320-7. doi:10.1016/j.mcn.2007.03.007.
- Su, J.H., Nichol, K.E., Sitch, T., Sheu, P., Chubb, C., Miller, B.L., Tomaselli, K.J., Kim, R.C., Cotman, C.W. 2000. DNA damage and activated caspase-3 expression in neurons and astrocytes: evidence for apoptosis in frontotemporal dementia. *Experimental neurology* 163(1), 9-19. doi:10.1006/exnr.2000.7340.
- Sultana, R., Mecocci, P., Mangialasche, F., Cecchetti, R., Baglioni, M., Butterfield, D.A. 2011. Increased protein and lipid oxidative damage in mitochondria isolated from lymphocytes from patients with Alzheimer's disease: insights into the role of oxidative stress in Alzheimer's disease and initial investigations into a potential biomarker for this dementing disorder. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 24(1), 77-84. doi:10.3233/jad-2011-101425.
- Sun, Z., Diaz, Z., Fang, X., Hart, M.P., Chesi, A., Shorter, J., Gitler, A.D. 2011. Molecular determinants and genetic modifiers of aggregation and toxicity for the ALS disease protein FUS/TLS. *PLoS biology* 9(4), e1000614. doi:10.1371/journal.pbio.1000614.
- Suzuki, H., Matsuoka, M. 2013. The JNK/c-Jun signaling axis contributes to the TDP-43-induced cell death. *Molecular and cellular biochemistry* 372(1-2), 241-8. doi:10.1007/s11010-012-1465-x.
- Swanberg, M.M. 2007. Memantine for behavioral disturbances in frontotemporal dementia: a case series. *Alzheimer disease and associated disorders* 21(2), 164-6. doi:10.1097/WAD.0b013e318047df5d.
- Swartz, J.R., Miller, B.L., Lesser, I.M., Darby, A.L. 1997. Frontotemporal dementia: treatment response to serotonin selective reuptake inhibitors. *The Journal of clinical psychiatry* 58(5), 212-6.
- Takahashi, A. 1999. Caspase: executioner and undertaker of apoptosis. *International journal of hematology* 70(4), 226-32.

- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5), 861-72. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Tang, W., Lu, Y., Tian, Q.Y., Zhang, Y., Guo, F.J., Liu, G.Y., Syed, N.M., Lai, Y., Lin, E.A., Kong, L., Su, J., Yin, F., Ding, A.H., Zanin-Zhorov, A., Dustin, M.L., Tao, J., Craft, J., Yin, Z., Feng, J.Q., Abramson, S.B., Yu, X.P., Liu, C.J. 2011. The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science (New York, NY)* 332(6028), 478-84. doi:10.1126/science.1199214.
- Tapia, L., Milnerwood, A., Guo, A., Mills, F., Yoshida, E., Vasuta, C., Mackenzie, I.R., Raymond, L., Cynader, M., Jia, W., Bamji, S.X. 2011. Progranulin deficiency decreases gross neural connectivity but enhances transmission at individual synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31(31), 11126-32. doi:10.1523/jneurosci.6244-10.2011.
- Taufenberger, A., Chitramuthu, B.P., Bateman, A., Bennett, H.P., Parker, J.A. 2013. Reduction of polyglutamine toxicity by TDP-43, FUS and progranulin in Huntington's disease models. *Human molecular genetics* 22(4), 782-94. doi:10.1093/hmg/dd485.
- Tedde, A., Piaceri, I., Bagnoli, S., Lucenteforte, E., Piacentini, S., Sorbi, S., Nacmias, B. 2012. DAPK1 is associated with FTD and not with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 32(1), 13-7. doi:10.3233/jad-2012-120556.
- Thomas, M.G., Loschi, M., Desbats, M.A., Boccaccio, G.L. 2011. RNA granules: the good, the bad and the ugly. *Cellular signalling* 23(2), 324-34. doi:10.1016/j.cellsig.2010.08.011.
- Thompson, S.A., Patterson, K., Hodges, J.R. 2003. Left/right asymmetry of atrophy in semantic dementia: behavioral-cognitive implications. *Neurology* 61(9), 1196-203.
- Timmermann, S., Hinds, P.W., Munger, K. 1997. Elevated activity of cyclin-dependent kinase 6 in human squamous cell carcinoma lines. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 8(4), 361-70.
- Tobinick, E. 2008. Perispinal etanercept produces rapid improvement in primary progressive aphasia: identification of a novel, rapidly reversible TNF-mediated pathophysiologic mechanism. *Medscape journal of medicine* 10(6), 135.
- Tollervey, J.R., Curk, T., Rogelj, B., Briese, M., Cereda, M., Kayikci, M., Konig, J., Hortobagyi, T., Nishimura, A.L., Zupunski, V., Patani, R., Chandran, S., Rot, G., Zupan, B., Shaw, C.E., Ule, J. 2011. Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nature neuroscience* 14(4), 452-8. doi:10.1038/nn.2778.
- Tooze, S.A., Schiavo, G. 2008. Liaisons dangereuses: autophagy, neuronal survival and neurodegeneration. *Current opinion in neurobiology* 18(5), 504-15. doi:10.1016/j.conb.2008.09.015.
- Toribio-Diaz, M.E., Morera-Guitart, J. 2008. [Clinical and biomolecular classification of the frontotemporal dementias. A review of the literature]. *Revista de neurologia* 47(11), 588-98.

- Trinczek, B., Biernat, J., Baumann, K., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E. 1995. Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Molecular biology of the cell* 6(12), 1887-902.
- Trojanowski, J.Q., Dickson, D. 2001. Update on the neuropathological diagnosis of frontotemporal dementias. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 60(12), 1123-6.
- Trojanowski, J.Q., Duff, K., Fillit, H., Koroshetz, W., Kuret, J., Murphy, D., Refolo, L. 2008. New directions for frontotemporal dementia drug discovery. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 4(2), 89-93. doi:10.1016/j.jalz.2007.06.001.
- Tsai, K.J., Yang, C.H., Fang, Y.H., Cho, K.H., Chien, W.L., Wang, W.T., Wu, T.W., Lin, C.P., Fu, W.M., Shen, C.K. 2010. Elevated expression of TDP-43 in the forebrain of mice is sufficient to cause neurological and pathological phenotypes mimicking FTL-D. *The Journal of experimental medicine* 207(8), 1661-73. doi:10.1084/jem.20092164.
- Tsuchiya, K., Ikeda, K., Mimura, M., Takahashi, M., Miyazaki, H., Anno, M., Shiotsu, H., Akabane, H., Niizato, K., Uchihara, T., Tominaga, I., Nakano, I. 2002. Constant involvement of the Betz cells and pyramidal tract in amyotrophic lateral sclerosis with dementia: a clinicopathological study of eight autopsy cases. *Acta neuropathologica* 104(3), 249-59. doi:10.1007/s00401-002-0543-7.
- Tury, A., Tolentino, K., Zou, Y. 2013. Altered expression of atypical PKC and Ryk in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Developmental neurobiology*. doi:10.1002/dneu.22137.
- Uberti, D., Carsana, T., Bernardi, E., Rodella, L., Grigolato, P., Lanni, C., Racchi, M., Govoni, S., Memo, M. 2002. Selective impairment of p53-mediated cell death in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *Journal of cell science* 115(Pt 15), 3131-8.
- Uchiyama, Y., Koike, M., Shibata, M., Sasaki, M. 2009. Autophagic neuron death. *Methods in enzymology* 453, 33-51. doi:10.1016/S0076-6879(08)04003-2.
- Ueberham, U., Hilbrich, I., Ueberham, E., Rohn, S., Glockner, P., Dietrich, K., Bruckner, M.K., Arendt, T. 2012. Transcriptional control of cell cycle-dependent kinase 4 by Smad proteins—implications for Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 33(12), 2827-40. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.01.013.
- Urwin, H., Ghazi-Noori, S., Collinge, J., Isaacs, A. 2009. The role of CHMP2B in frontotemporal dementia. *Biochemical Society transactions* 37(Pt 1), 208-12. doi:10.1042/bst0370208.
- Urwin, H., Josephs, K.A., Rohrer, J.D., Mackenzie, I.R., Neumann, M., Authier, A., Seelaar, H., Van Swieten, J.C., Brown, J.M., Johannsen, P., Nielsen, J.E., Holm, I.E., Dickson, D.W., Rademakers, R., Graff-Radford, N.R., Parisi, J.E., Petersen, R.C., Hatanpaa, K.J., White, C.L., 3rd, Weiner, M.F., Geser, F., Van Deerlin, V.M., Trojanowski, J.Q., Miller, B.L., Seeley, W.W., van der Zee, J., Kumar-Singh, S., Engelborghs, S., De Deyn, P.P., Van Broeckhoven, C., Bigio, E.H., Deng, H.X., Halliday, G.M., Kril, J.J., Munoz, D.G., Mann, D.M., Pickering-Brown, S.M., Doodeman, V., Adamson, G., Ghazi-Noori, S., Fisher, E.M., Holton, J.L., Revesz, T., Rossor, M.N., Collinge, J., Mead, S., Isaacs, A.M. 2010. FUS pathology defines the majority of tau- and TDP-43-negative frontotem-

- poral lobar degeneration. *Acta neuropathologica* 120(1), 33-41. doi:10.1007/s00401-010-0698-6.
- Vaccaro, A., Tauffenberger, A., Aggad, D., Rouleau, G., Drapeau, P., Parker, J.A. 2012. Mutant TDP-43 and FUS cause age-dependent paralysis and neurodegeneration in *C. elegans*. *PloS one* 7(2), e31321. doi:10.1371/journal.pone.0031321.
- van Balken, I., Litvan, I. 2006. Current and future treatments in progressive supranuclear palsy. *Current treatment options in neurology* 8(3), 211-23.
- Van Damme, P., Van Hoecke, A., Lambrechts, D., Vanacker, P., Bogaert, E., van Swieten, J., Carmeliet, P., Van Den Bosch, L., Robberecht, W. 2008. Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival. *The Journal of cell biology* 181(1), 37-41. doi:10.1083/jcb.200712039.
- Van Damme, P., Veldink, J.H., van Blitterswijk, M., Corveleyn, A., van Vught, P.W., Thijs, V., Dubois, B., Matthijs, G., van den Berg, L.H., Robberecht, W. 2011. Expanded ATXN2 CAG repeat size in ALS identifies genetic overlap between ALS and SCA2. *Neurology* 76(24), 2066-72. doi:10.1212/WNL.0b013e31821f445b.
- van der Zee, J., Le Ber, I., Maurer-Stroh, S., Engelborghs, S., Gijssels, I., Camuzat, A., Brouwers, N., Vandenberghe, R., Sleegers, K., Hannequin, D., Dermaut, B., Schymkowitz, J., Campion, D., Santens, P., Martin, J.J., Lacomblez, L., De Pooter, T., Peeters, K., Mattheijssens, M., Vercelletto, M., Van den Broeck, M., Cruts, M., De Deyn, P.P., Rousseau, F., Brice, A., Van Broeckhoven, C. 2007. Mutations other than null mutations producing a pathogenic loss of progranulin in frontotemporal dementia. *Human mutation* 28(4), 416. doi:10.1002/humu.9484.
- van der Zee, J., Van Langenhove, T., Kleinberger, G., Sleegers, K., Engelborghs, S., Vandenberghe, R., Santens, P., Van den Broeck, M., Joris, G., Brys, J., Mattheijssens, M., Peeters, K., Cras, P., De Deyn, P.P., Cruts, M., Van Broeckhoven, C. 2011. TMEM106B is associated with frontotemporal lobar degeneration in a clinically diagnosed patient cohort. *Brain : a journal of neurology* 134(Pt 3), 808-15. doi:10.1093/brain/awr007.
- van Eersel, J., Ke, Y.D., Gladbach, A., Bi, M., Gotz, J., Kril, J.J., Ittner, L.M. 2011. Cytoplasmic accumulation and aggregation of TDP-43 upon proteasome inhibition in cultured neurons. *PloS one* 6(7), e22850. doi:10.1371/journal.pone.0022850.
- van Swieten, J.C., Heutink, P. 2008. Mutations in progranulin (GRN) within the spectrum of clinical and pathological phenotypes of frontotemporal dementia. *Lancet neurology* 7(10), 965-74. doi:10.1016/s1474-4422(08)70194-7.
- Varani, L., Spillantini, M.G., Goedert, M., Varani, G. 2000. Structural basis for recognition of the RNA major groove in the tau exon 10 splicing regulatory element by aminoglycoside antibiotics. *Nucleic acids research* 28(3), 710-9.
- Varma, A.R., Adams, W., Lloyd, J.J., Carson, K.J., Snowden, J.S., Testa, H.J., Jackson, A., Neary, D. 2002. Diagnostic patterns of regional atrophy on MRI and regional cerebral blood flow change on SPECT in young onset patients with Alzheimer's disease, frontotemporal dementia and vascular dementia. *Acta neurologica Scandinavica* 105(4), 261-9.

- Vassall, K.A., Stubbs, H.R., Primmer, H.A., Tong, M.S., Sullivan, S.M., Sobering, R., Srinivasan, S., Briere, L.A., Dunn, S.D., Colon, W., Meiering, E.M. 2011. Decreased stability and increased formation of soluble aggregates by immature superoxide dismutase do not account for disease severity in ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(6), 2210-5. doi:10.1073/pnas.0913021108.
- Vengoechea, J., David, M.P., Yaghi, S.R., Carpenter, L., Rudnicki, S.A. 2013a. Clinical variability and female penetrance in X-linked familial FTD/ALS caused by a P506S mutation in UBQLN2. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration*. doi:10.3109/21678421.2013.824001.
- Vengoechea, J., David, M.P., Yaghi, S.R., Carpenter, L., Rudnicki, S.A. 2013b. Clinical variability and female penetrance in X-linked familial FTD/ALS caused by a P506S mutation in UBQLN2. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration* 14(7-8), 615-9. doi:10.3109/21678421.2013.824001.
- Verma, A. 2013. Protein aggregates and regional disease spread in ALS is reminiscent of prion-like pathogenesis. *Neurology India* 61(2), 107-10. doi:10.4103/0028-3886.111109.
- Ververis, K., Karagiannis, T.C. 2011. Potential non-oncological applications of histone deacetylase inhibitors. *American journal of translational research* 3(5), 454-67.
- Vossel, K.A., Miller, B.L. 2008. New approaches to the treatment of frontotemporal lobar degeneration. *Current opinion in neurology* 21(6), 708-16. doi:10.1097/WCO.0b013e328318444d.
- Vuga, L.J., Ben-Yehudah, A., Kovkarova-Naumovski, E., Oriss, T., Gibson, K.F., Feghali-Bostwick, C., Kaminski, N. 2009. WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 41(5), 583-9. doi:10.1165/rcmb.2008-0201OC.
- Wang, F., Gregory, C., Sample, C., Rowe, M., Liebowitz, D., Murray, R., Rickinson, A., Kieff, E. 1990. Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *Journal of virology* 64(5), 2309-18.
- Wang, H.Y., Wang, I.F., Bose, J., Shen, C.K. 2004. Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family. *Genomics* 83(1), 130-9.
- Wang, I.F., Guo, B.S., Liu, Y.C., Wu, C.C., Yang, C.H., Tsai, K.J., Shen, C.K. 2012. Autophagy activators rescue and alleviate pathogenesis of a mouse model with proteinopathies of the TAR DNA-binding protein 43. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(37), 15024-9. doi:10.1073/pnas.1206362109.
- Wang, I.F., Reddy, N.M., Shen, C.K. 2002. Higher order arrangement of the eukaryotic nuclear bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(21), 13583-8. doi:10.1073/pnas.212483099.
- Wang, I.F., Tsai, K.J., Shen, C.K. 2013. Autophagy activation ameliorates neuronal pathogenesis of FTLD-U mice:

- a new light for treatment of TARDBP/TDP-43 proteinopathies. *Autophagy* 9(2), 239-40. doi:10.4161/auto.22526.
- Wang, I.F., Wu, L.S., Shen, C.K. 2008. TDP-43: an emerging new player in neurodegenerative diseases. *Trends in molecular medicine* 14(11), 479-85. doi:10.1016/j.molmed.2008.09.001.
- Wang, J.Z., Liu, F. 2008. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Progress in neurobiology* 85(2), 148-75. doi:10.1016/j.pneurobio.2008.03.002.
- Wang, P.S., Brookhart, M.A., Setoguchi, S., Patrick, A.R., Schneeweiss, S. 2006. Psychotropic medication use for behavioral symptoms of dementia. *Current neurology and neuroscience reports* 6(6), 490-5.
- Wang, W.X., Wilfred, B.R., Madathil, S.K., Tang, G., Hu, Y., Dimayuga, J., Stromberg, A.J., Huang, Q., Saatman, K.E., Nelson, P.T. 2010. miR-107 regulates granulin/progranulin with implications for traumatic brain injury and neurodegenerative disease. *The American journal of pathology* 177(1), 334-45. doi:10.2353/ajpath.2010.091202.
- Wang, X., Fan, H., Ying, Z., Li, B., Wang, H., Wang, G. 2010. Degradation of TDP-43 and its pathogenic form by autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Neuroscience letters* 469(1), 112-6. doi:10.1016/j.neulet.2009.11.055.
- Warraich, S.T., Yang, S., Nicholson, G.A., Blair, I.P. 2010. TDP-43: a DNA and RNA binding protein with roles in neurodegenerative diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42(10), 1606-9. doi:10.1016/j.biocel.2010.06.016.
- Watts, G.D., Wymer, J., Kovach, M.J., Mehta, S.G., Mumm, S., Darvish, D., Pestronk, A., Whyte, M.P., Kimonis, V.E. 2004. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nature genetics* 36(4), 377-81. doi:10.1038/ng1332.
- Waugh, M.G., Minogue, S., Anderson, J.S., Balinger, A., Blumenkrantz, D., Calnan, D.P., Cramer, R., Hsuan, J.J. 2003. Localization of a highly active pool of type II phosphatidylinositol 4-kinase in a p97/valosin-containing-protein-rich fraction of the endoplasmic reticulum. *The Biochemical journal* 373(Pt 1), 57-63. doi:10.1042/bj20030089.
- Wegorzewska, I., Bell, S., Cairns, N.J., Miller, T.M., Baloh, R.H. 2009. TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(44), 18809-14. doi:10.1073/pnas.0908767106.
- Welch, E.M., Barton, E.R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W.J., Trifillis, P., Paushkin, S., Patel, M., Trotta, C.R., Hwang, S., Wilde, R.G., Karp, G., Takasugi, J., Chen, G., Jones, S., Ren, H., Moon, Y.C., Corson, D., Turpoff, A.A., Campbell, J.A., Conn, M.M., Khan, A., Almstead, N.G., Hedrick, J., Mollin, A., Risher, N., Weetall, M., Yeh, S., Branstrom, A.A., Colacino, J.M., Babiak, J., Ju, W.D., Hirawat, S., Northcutt, V.J., Miller, L.L., Spatrick, P., He, F., Kawana, M., Feng, H., Jacobson, A., Peltz, S.W., Sweeney, H.L. 2007. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447(7140), 87-91. doi:10.1038/nature05756.
- Wexler, E.M., Rosen, E., Lu, D., Osborn, G.E., Martin, E., Raybould, H., Geschwind, D.H. 2011. Genome-wide

analysis of a Wnt1-regulated transcriptional network implicates neurodegenerative pathways. *Science signaling* 4(193), ra65. doi:10.1126/scisignal.2002282.

Whiteway, S.L., Harris, P.S., Venkataraman, S., Alimova, I., Birks, D.K., Donson, A.M., Foreman, N.K., Vibhakkar, R. 2013. Inhibition of cyclin-dependent kinase 6 suppresses cell proliferation and enhances radiation sensitivity in medulloblastoma cells. *Journal of neuro-oncology* 111(2), 113-21. doi:10.1007/s11060-012-1000-7.

Wilhelmsen, K.C., Lynch, T., Pavlou, E., Higgins, M., Nygaard, T.G. 1994. Localization of disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex to 17q21-22. *American journal of human genetics* 55(6), 1159-65.

Wilson, C.H., McIntyre, R.E., Arends, M.J., Adams, D.J. 2010. The activating mutation R201C in GNAS promotes intestinal tumorigenesis in Apc(Min/+) mice through activation of Wnt and ERK1/2 MAPK pathways. *Oncogene* 29(32), 4567-75. doi:10.1038/onc.2010.202.

Wischik, C.M., Edwards, P.C., Lai, R.Y., Roth, M., Harrington, C.R. 1996. Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(20), 11213-8.

Wojcik, C. 2002. VCP - the missing link in protein degradation? *Trends in cell biology* 12(5), 212.

Wolfe, M.S. 2009. Tau mutations in neurodegenerative diseases. *The Journal of biological chemistry* 284(10), 6021-5. doi:10.1074/jbc.R800013200.

Wong, E., Cuervo, A.M. 2010. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nature neuroscience* 13(7), 805-11. doi:10.1038/nn.2575.

Wu, L.S., Cheng, W.C., Hou, S.C., Yan, Y.T., Jiang, S.T., Shen, C.K. 2010. TDP-43, a neuro-pathosignature factor, is essential for early mouse embryogenesis. *Genesis (New York, NY : 2000)* 48(1), 56-62. doi:10.1002/dvg.20584.

Xu, G., Stevens, S.M., Jr., Moore, B.D., McClung, S., Borchelt, D.R. 2013. Cytosolic proteins lose solubility as amyloid deposits in a transgenic mouse model of Alzheimer-type amyloidosis. *Human molecular genetics* 22(14), 2765-74. doi:10.1093/hmg/ddt121.

Xu, J., Xilouri, M., Bruban, J., Shioi, J., Shao, Z., Papazoglou, I., Vekrellis, K., Robakis, N.K. 2011a. Extracellular progranulin protects cortical neurons from toxic insults by activating survival signaling. *Neurobiology of aging* 32(12), 2326 e5-16. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.06.017.

Xu, J., Xilouri, M., Bruban, J., Shioi, J., Shao, Z., Papazoglou, I., Vekrellis, K., Robakis, N.K. 2011b. Extracellular progranulin protects cortical neurons from toxic insults by activating survival signaling. *Neurobiology of aging* 32(12), 2326.e5-16. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.06.017.

Xu, Y.F., Gendron, T.F., Zhang, Y.J., Lin, W.L., D'Alton, S., Sheng, H., Casey, M.C., Tong, J., Knight, J., Yu, X., Rademakers, R., Boylan, K., Hutton, M., McGowan, E., Dickson, D.W., Lewis, J., Petrucelli, L. 2010. Wild-type

- human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(32), 10851-9. doi:10.1523/jneurosci.1630-10.2010.
- Xu, Z.S. 2012. Does a loss of TDP-43 function cause neurodegeneration? *Molecular neurodegeneration* 7, 27. doi:10.1186/1750-1326-7-27.
- Yamamoto, A., Simonsen, A. 2011. The elimination of accumulated and aggregated proteins: a role for autophagy in neurodegeneration. *Neurobiology of disease* 43(1), 17-28. doi:10.1016/j.nbd.2010.08.015.
- Yancopoulou, D., Spillantini, M.G. 2003. Tau protein in familial and sporadic diseases. *Neuromolecular medicine* 4(1-2), 37-48. doi:10.1385/nmm:4:1-2:37.
- Yang, Y., Mufson, E.J., Herrup, K. 2003. Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23(7), 2557-63.
- Yang, Y., Schmitt, H.P. 2001. Frontotemporal dementia: evidence for impairment of ascending serotonergic but not noradrenergic innervation. Immunocytochemical and quantitative study using a graph method. *Acta neuropathologica* 101(3), 256-70.
- Yeh, T.C., Marsh, V., Bernat, B.A., Ballard, J., Colwell, H., Evans, R.J., Parry, J., Smith, D., Brandhuber, B.J., Gross, S., Marlow, A., Hurley, B., Lyssikatos, J., Lee, P.A., Winkler, J.D., Koch, K., Wallace, E. 2007. Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13(5), 1576-83. doi:10.1158/1078-0432.ccr-06-1150.
- Yin, F., Banerjee, R., Thomas, B., Zhou, P., Qian, L., Jia, T., Ma, X., Ma, Y., Iadecola, C., Beal, M.F., Nathan, C., Ding, A. 2010a. Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 207(1), 117-28. doi:10.1084/jem.20091568.
- Yin, F., Dumont, M., Banerjee, R., Ma, Y., Li, H., Lin, M.T., Beal, M.F., Nathan, C., Thomas, B., Ding, A. 2010b. Behavioral deficits and progressive neuropathology in progranulin-deficient mice: a mouse model of frontotemporal dementia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24(12), 4639-47. doi:10.1096/fj.10-161471.
- Yokoseki, A., Shiga, A., Tan, C.F., Tagawa, A., Kaneko, H., Koyama, A., Eguchi, H., Tsujino, A., Ikeuchi, T., Kakita, A., Okamoto, K., Nishizawa, M., Takahashi, H., Onodera, O. 2008. TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 63(4), 538-42. doi:10.1002/ana.21392.
- Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.M., Iwata, N., Saido, T.C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. 2007. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53(3), 337-51. doi:10.1016/j.neuron.2007.01.010.
- Yu, B.P., Chung, H.Y. 2006. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. *Mechanisms of ageing and development* 127(5), 436-43. doi:10.1016/j.mad.2006.01.023.

- Yu, C.E., Bird, T.D., Bekris, L.M., Montine, T.J., Leverenz, J.B., Steinbart, E., Galloway, N.M., Feldman, H., Woltjer, R., Miller, C.A., Wood, E.M., Grossman, M., McCluskey, L., Clark, C.M., Neumann, M., Danek, A., Galasko, D.R., Arnold, S.E., Chen-Plotkin, A., Karydas, A., Miller, B.L., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., Schellenberg, G.D., Van Deerlin, V.M. 2010. The spectrum of mutations in progranulin: a collaborative study screening 545 cases of neurodegeneration. *Archives of neurology* 67(2), 161-70. doi:10.1001/archneurol.2009.328.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I., Thomson, J.A. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, NY)* 318(5858), 1917-20. doi:10.1126/science.1151526.
- Yu, J.M., Jun, E.S., Jung, J.S., Suh, S.Y., Han, J.Y., Kim, J.Y., Kim, K.W., Jung, J.S. 2007. Role of Wnt5a in the proliferation of human glioblastoma cells. *Cancer letters* 257(2), 172-81. doi:10.1016/j.canlet.2007.07.011.
- Zanocco-Marani, T., Bateman, A., Romano, G., Valentini, B., He, Z.H., Baserga, R. 1999. Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor. *Cancer research* 59(20), 5331-40.
- Zhang, B., Maiti, A., Shively, S., Lakhani, F., McDonald-Jones, G., Bruce, J., Lee, E.B., Xie, S.X., Joyce, S., Li, C., Toleikis, P.M., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. 2005. Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(1), 227-31. doi:10.1073/pnas.0406361102.
- Zhang, J., Li, Y., Wu, Y., Yang, T., Yang, K., Wang, R., Yang, J., Guo, H. 2013. Wnt5a inhibits the proliferation and melanogenesis of melanocytes. *International journal of medical sciences* 10(6), 699-706. doi:10.7150/ijms.5664.
- Zhang, Y., Schuff, N., Du, A.T., Rosen, H.J., Kramer, J.H., Gorno-Tempini, M.L., Miller, B.L., Weiner, M.W. 2009. White matter damage in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease measured by diffusion MRI. *Brain : a journal of neurology* 132(Pt 9), 2579-92. doi:10.1093/brain/awp071.
- Zhang, Y.J., Xu, Y.F., Cook, C., Gendron, T.F., Roettges, P., Link, C.D., Lin, W.L., Tong, J., Castaneda-Casey, M., Ash, P., Gass, J., Rangachari, V., Buratti, E., Baralle, F., Golde, T.E., Dickson, D.W., Petrucelli, L. 2009. Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(18), 7607-12. doi:10.1073/pnas.0900688106.
- Zhang, Z.Z., Gong, Y.Y., Shi, Y.H., Zhang, W., Qin, X.H., Wu, X.W. 2012. Valproate promotes survival of retinal ganglion cells in a rat model of optic nerve crush. *Neuroscience* 224, 282-93. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.07.056.
- Zheng, Y., Brady, O.A., Meng, P.S., Mao, Y., Hu, F. 2011. C-terminus of progranulin interacts with the beta-propeller region of sortilin to regulate progranulin trafficking. *PloS one* 6(6), e21023. doi:10.1371/journal.pone.0021023.
- Zhou, X., Jia, J. 2010. P53-mediated G(1)/S checkpoint dysfunction in lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *Neuroscience letters* 468(3), 320-5. doi:10.1016/j.neulet.2009.11.024.

Resumen en Inglés



Resumen en inglés

ROLE OF PROGRANULIN ON THE MECHANISMS OF REGULATION OF CELL SURVIVAL/DEATH IN THE FRONTOTEMPOAL LOBAR DEGENERATION

Introduction:

Frontotemporal lobar degeneration (FTLD) is a genetically complex neurodegenerative disorder, accounting for 20% of patients with an onset of dementia before 65 years (Ikeda, et al., 2004). The clinical symptoms associated with FTLD are diverse, including behavior and personality changes, language disorders of expression and comprehension and cognitive impairment with early preservation of memory (Neary, et al., 1998). To date, the clinicopathologic spectrum of FTLD includes not only the frontal and temporal variants of FTD, frontotemporal degeneration with abnormal behavior (bvFTD), primary progressive aphasia (PPA) or semantic dementia (SD), but also corticobasal degeneration (CBD), progressive supranuclear palsy (PSP), progressive subcortical gliosis (PSG) and FTD with motor neuron disease (FTD-EMN) (Van Langenhove, et al., 2012). Under a microscope, common pathologic changes of FTLD are atrophy brain region presenting neuronal loss and gliosis in cortices of atrophied frontal and temporal lobes. Histochemically, FTLD can be categorized according to the major component of the cellular inclusions deposited in the brain. In the majority of cases, the pathological protein is either the microtubule-associated protein tau or the transactive response DNA-binding protein TDP-43 (FTLD-tau, FTLD-TDP respectively), a small number of cases present inclusions of fused in sarcoma (FUS) protein (FTLD-FUS) or inclusions of a protein that can not be identified and that can only be unveiled by immunostaining against the proteins of the ubiquitin proteasome system (UPS) (FTLD-UPS) (Cairns, et al., 2007, Mackenzie, et al., 2011).

A positive family history of FTLD is present in 25-50% of cases and the transmission is usually autosomal dominant. A few genes have been associated with familial FTLD including *microtubule-associated protein tau (MAPT)*, *progranulin (GRN)* (Baker), *transactive response (TAR) DNA-binding protein-43 (TARDBP)*, *chromatin-modifying 2B protein*

(*CHMP2B*), *Valosin-containing protein* (*VCP*), and *chromosome 9 open reading frame 72* (*C9ORF72*) genes (Sieben, et al., 2012).

Mutations in the *GRN* gene are the major cause of familial FTLT-TDP (Baker, et al., 2006, Cruts, et al., 2006). To date, more than 60 mutations have been reported in *GRN* gene (Gijssels, et al., 2008). Most of the pathogenic mutations are predicted to cause functional null alleles with premature termination of the *GRN* coding sequence, resulting in nonsense-mediated decay (NMD) of the mutant messenger RNAs (mRNAs), suggesting that progranulin (PGRN) haploinsufficiency is a major pathogenic mechanism.

Little is known about the normal function of PGRN in the Central Nervous System (CNS) and the mechanism by which PGRN haploinsufficiency leads to neurodegeneration in FTLT remained speculative. In the last decade, mounting evidences support the hypothesis that cell cycle reentry of postmitotic neurons and neural stem cells precedes many instances of neuronal death (Herrup, et al., 2004). Based in the mitogenic and neurotrophic activities of PGRN, we hypothesized that PGRN deficit may induce cell cycle disturbances and alterations in neuronal vulnerability.

An alternative strategy to study the pathogenesis of FTLT is the use of non-neuronal cells from patients. Numerous observations indicate that, while the predominant clinical expression arises from brain, the neurodegenerative diseases have systemic expression at the cellular and molecular levels. Considerable precedents exist for studying neurodegenerative diseases with peripheral tissues including lymphocytes, fibroblast and platelets (Bialopiotrowicz, et al., 2012). The use of peripheral tissues could complement studies of autopsy samples and provide a useful tool with which to investigate dynamic processes such as signal transduction mechanisms, oxidative metabolism among others.

Aims:

The main goal of this work was to study the influence of PGRN haploinsufficiency, caused by a prevalent ancestral mutation in *GRN* gene related to Basque population, c.709-1G>A, in cell cycle and survival regulation of peripheral blood cells from carriers of the *GRN* mutation. The possibility to detect molecular alterations in non-neuronal cells, easily accessible, from control, asymptomatic and patients, could provide a useful tool for the early diagnosis of this complex disorder, and particularly to search for treatment or neuroprotective strategies.

To this end, we generated lymphoblastoid cell lines from c.709-1G>A carriers diagnosed of FTLD or asymptomatic and control individuals by infecting with the Epstein Barr virus (EBV). Although FTLD symptoms reflect preferential neuronal loss in specific brain regions, PGRN is expressed in almost all tissues, so abnormalities outside the brain might be expected. Moreover, this experimental model has been previously used to study cell cycle-related events associated with neurodegeneration in other neurodegenerative diseases, e. g. Alzheimer's disease.

Results:

Our results show that PGRN haploinsufficiency increased cell cycle activity in immortalized lymphocytes from FTLD patients. This effect was associated with increased levels of cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) and phosphorylation of retinoblastoma protein (pRb), resulting in a G₁/S regulatory failure. In addition, the lymphoblast carriers of the c.709-1G>A mutation display a small but significant decrease in the nuclear content of TDP-43. Taken together, these observations suggest that a loss of nuclear TDP-43 function in repressing CDK6 may be involved in the increased pRb phosphorylation, and enhanced proliferative activity of PGRN deficient cells. Assuming that the cell cycle disturbances reported here could be peripheral signs of the disease, our results suggest that neurons of c.709-

1G>A mutation carriers are at high risk of entering an unscheduled cell cycle that would then drive them to death. It is suggested that therapeutic interventions aimed at ameliorating cell cycle progression activity may have a positive impact in FTLT.

Using the same cells of FTLT patients, we performed a comparative study of cell viability after serum withdrawal of established lymphoblastoid cell lines from control and carriers of c.709-1G>A *GRN* mutation. Our results suggest that the CDK6/pRb pathway also is enhanced after the serum deprivation. Apparently, this feature allows PGRN deficient cells to escape from serum withdrawal induced apoptosis by decreasing the activity of executive caspases and lowering the dissipation of mitochondrial membrane potential and the release of cytochrome c from the mitochondria. Inhibitors of CDK6 expression levels like sodium butyrate or the CDK6 activity such as PD332991 were able to restore the normal response of lymphoblasts from FTLT-TDP patients to trophic factor withdrawal or cell proliferation. Our results suggested that CDK6 could be potentially a therapeutic target for the treatment of the FTLT-TDP.

The next step in this work was analyzing potential alterations in signaling pathways induced by PGRN haploinsufficiency to explain the altered cellular response to serum stimulation. To this end we use specific inhibitors of main pathways as well as conditioned medium from control and PGRN-deficient lymphoblast or exogenous recombinant human PGRN (rhPGRN). Our results show that the specific signaling cascade implicated in the up-regulation of CDK6 activity and cell proliferation of *GRN* mutation bearing lymphoblasts is Ca^{2+} , protein kinase C (PKC), and pertussis toxin (PTX)-dependent and involves activation of the extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 (ERK1/2) pathway. Addition of exogenous PGRN or conditioned medium from control cells normalized the response of PGRN-deficient lymphoblasts to serum activation. Our data indicated that non-canonical Wnt5a signaling might be overactivated by PGRN deficiency. We detected increased cellular and secreted levels of Wnt5a in PGRN-deficient lymphoblasts associated with enhanced phosphorylated calmodulin kinase II (pCaMKII). Moreover, treatment of control cells with exogenous Wnt5a activated Ca^{2+} /calmodulin kinase II (CaMKII), increased activity of the

ERK1/2 pathway and cell proliferation up to the levels found in c.709-1G>A carrier cells. PGRN knockdown SH-SY5Y neuroblastoma cells also show enhanced Wnt5a content and signaling. Taken together, our results revealed an important role of Wnt signaling in FTLD-TDP pathology and suggest a novel target for therapeutic intervention.

One of the aims in this thesis was to search for new clinical approximations and therapies for the treatment of FTLD-TDP using lymphoblastoid cell lines from carriers of c.709-1G>A *GRN* mutation. In this regard, we investigated the effects of drugs able to increase PGRN levels, either activating the *GRN* gene expression such as SAHA, or at post-translational level as chloroquine (CQ), as well as specific inhibitors of the ERK1/2 signaling cascade such as Selumetinib or MEK162. Considering the haploinsufficiency mechanism, *GRN* is a particularly appealing gene for drug targeting. On the other hand, given that PGRN deficit appears to induce alterations in the ERK1/2 cascade, it is possible to envision new avenues for therapeutic intervention in PGRN-deficient FTLD. In this regard, the use of highly selective inhibitors of BRAF (v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog B1) and MEK1/2 (Mitogen-activated protein kinase kinase or ERK kinase 1 and 2), the upstream activators of ERK1/2, have shown promising results in clinical trials, including in previously intractable diseases such as melanoma. Our results indicate that SAHA and CQ were effective in restoring the PGRN levels of c.709-1G>A carriers, and prevented the enhanced activation of ERK1/2 activity. Selumetinib, and MEK160, inhibitors of the ERK1/2 cascade, normalized the response of PGRN deficient lymphoblasts to serum activation. Both sets of drugs ultimately modulate the CDK6/pRb pathway and therefore regulate cell survival/death mechanisms. Considering that these drugs are already used in clinic for treatment of other diseases, with good tolerance, it is plausible that they may serve as novel therapeutic drugs for FTLD associated to *GRN* mutations.

Conclusions:

- 1.- Our results suggest that the CDK6/pRb pathway is enhanced in the c.709-1G>A mutation bearing lymphoblasts and this feature is controlling the mechanism of regulation of proliferation/death in progranulin deficient cells.
- 2.- Our results established a molecular link between misslocalization of TDP-43 and increased CDK6 levels, pRb phosphorylation, and the control of proliferation/death in lymphoblasts from c.709-1G>A carriers
- 3.- We provided evidence that PGRN haplinsufficiency aberrantly increased noncanonical $G_{\alpha i}$ dependent-Wnt signaling leading to activation of ERK1/2-mediated stimulation of proliferation of lymphoblast derived from individuals bearing the FTLD-associated GRN mutation.
- 4.- Our results indicate that the use of drugs able to increase PGRN levels or blocking the ERK1/2 pathway, restore the normal cell response to serum stimulation, by preventing the overactivation of the CDK6/pRb cascade in c.709-1G>A GRN mutation carriers.
- 5.- The distinct functional features of lymphoblastoid cell from c.709-1G>A carriers offer an invaluable, noninvasive tool to investigate the etiopathogenesis of FTLD.

References:

- Baker, M., Mackenzie, I.R., Pickering-Brown, S.M., Gass, J., Rademakers, R., Lindholm, C., Snowden, J., Adamson, J., Sadovnick, A.D., Rollinson, S., Cannon, A., Dwosh, E., Neary, D., Melquist, S., Richardson, A., Dickson, D., Berger, Z., Eriksen, J., Robinson, T., Zehr, C., Dickey, C.A., Crook, R., McGowan, E., Mann, D., Boeve, B., Feldman, H., Hutton, M. 2006. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 442(7105), 916-9. doi:10.1038/nature05016.
- Bialopiotrowicz, E., Szybinska, A., Kuzniewska, B., Buizza, L., Uberti, D., Kuznicki, J., Wojda, U. 2012. Highly pathogenic Alzheimer's disease presenilin 1 P117R mutation causes a specific increase in p53 and p21 protein levels and cell cycle dysregulation in human lymphocytes. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 32(2), 397-415. doi:10.3233/jad-2012-121129.
- Cairns, N.J., Bigio, E.H., Mackenzie, I.R., Neumann, M., Lee, V.M., Hatanpaa, K.J., White, C.L., 3rd, Schneider, J.A., Grinberg, L.T., Halliday, G., Duyckaerts, C., Lowe, J.S., Holm, I.E., Tolnay, M., Okamoto, K., Yokoo, H., Murayama, S., Woulfe, J., Munoz, D.G., Dickson, D.W., Ince, P.G., Trojanowski, J.Q., Mann, D.M. 2007. Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta neuropathologica* 114(1), 5-22. doi:10.1007/s00401-007-0237-2.
- Cruts, M., Gijselinck, I., van der Zee, J., Engelborghs, S., Wils, H., Pirici, D., Rademakers, R., Vandenbergh, R., Dermaut, B., Martin, J.J., van Duijn, C., Peeters, K., Sciot, R., Santens, P., De Pooter, T., Mattheijssens, M., Van den Broeck, M., Cuijt, I., Vennekens, K., De Deyn, P.P., Kumar-Singh, S., Van Broeckhoven, C. 2006. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* 442(7105), 920-4. doi:10.1038/nature05017.
- Gijselinck, I., Van Broeckhoven, C., Cruts, M. 2008. Granulin mutations associated with frontotemporal lobar degeneration and related disorders: an update. *Human mutation* 29(12), 1373-86. doi:10.1002/humu.20785.
- Herrup, K., Neve, R., Ackerman, S.L., Copani, A. 2004. Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24(42), 9232-9. doi:10.1523/jneurosci.3347-04.2004.
- Ikeda, M., Ishikawa, T., Tanabe, H. 2004. Epidemiology of frontotemporal lobar degeneration. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 17(4), 265-8. doi:10.1159/000077151.
- Mackenzie, I.R., Neumann, M., Cairns, N.J., Munoz, D.G., Isaacs, A.M. 2011. Novel types of frontotemporal lobar degeneration: beyond tau and TDP-43. *Journal of molecular neuroscience : MN* 45(3), 402-8. doi:10.1007/s12031-011-9551-1.
- Neary, D., Snowden, J.S., Gustafson, L., Passant, U., Stuss, D., Black, S., Freedman, M., Kertesz, A., Robert, P.H., Albert, M., Boone, K., Miller, B.L., Cummings, J., Benson, D.F. 1998. Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 51(6), 1546-54.
- Sieben, A., Van Langenhove, T., Engelborghs, S., Martin, J.J., Boon, P., Cras, P., De Deyn, P.P., Santens, P., Van Broeckhoven, C., Cruts, M. 2012. The genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration. *Acta neuropathologica* 124(3), 353-72. doi:10.1007/s00401-012-1029-x.
- Van Langenhove, T., van der Zee, J., Van Broeckhoven, C. 2012. The molecular basis of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum. *Annals of medicine* 44(8), 817-28. doi:10.3109/07853890.2012.665471.